

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CIBLAGE PHARMACOLOGIQUE ET RÔLE DE MT1-MMP DANS L'INFLAMMATION
TUMORALE CÉRÉBRALE

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
ASMAA SINA

JUILLET 2010

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522-Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche et ami, le Dr Borhane Annabi, pour la confiance qu'il m'a accordée et l'accueil chaleureux au sein de son laboratoire. Cela tient aussi à la fois à son encadrement scientifique et ses conseils toujours judicieux. Son support et son optimisme m'ont permis de réussir ma maîtrise et m'ont donné le goût de la recherche. J'ai eu l'immense privilège de participer à la publication de plusieurs articles durant mon cursus d'étude, et Borhane y est pour beaucoup dans ce succès.

Mes vifs remerciements à Marie-Paule pour son support technique. Je tiens également à témoigner toute mon amitié et ma reconnaissance aux membres du Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, notamment Sébastien, Jinane, Elizabeth, Eric et Karine, pour les nombreux encouragements et les bons moments passés ensemble, ce fut très agréable de vous côtoyer.

Je ne saurais manquer de remercier tout particulièrement les membres de ma famille, particulièrement mon père et ma mère pour leur soutien, leur amour et leur confiance en moi. Une mention spéciale est à souligner à mes amis, personnellement Dany, pour le support et l'appui qu'ils m'ont offert.

Enfin, je tiens à souligner la contribution de l'organisme des Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) pour leur soutien financier.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	viii
RÉSUMÉ	x
CHAPITRE I	1
INTRODUCTION	1
1.1. Le cancer	1
1.1.1. Généralités	1
1.1.2. La cancérogenèse	1
1.1.3. La métastase	2
1.1.4. L'angiogenèse	3
1.1.5. L'inflammation	5
1.1.5.1. Le rôle de la voie de signalisation NF- κ B dans la progression tumorale induite par l'inflammation	6
1.1.5.2. La contribution de la protéine pro-inflammatoire Cox-2 dans la carcinogenèse	8
1.2. Les métalloprotéinases de la matrice extracellulaire (MMPs)	9
1.2.1. La matrice extracellulaire	9
1.2.2. Classification et structure des MMPs	10
1.2.3. Expression et régulation de MT1-MMP	11
1.2.3.1. L'expression génique	11
1.2.3.2. Le rôle classique de MT1-MMP : l'activation de la proMMP-2	12
1.2.4. Inhibiteurs biologiques et synthétiques des MMPs	13
1.2.4.1. Inhibiteurs endogènes	13
1.2.4.2. Inhibiteurs synthétiques	14

1.3. Glioblastomes et thérapies	15
1.3.1. Glioblastomes	15
1.3.2. Ciblage pharmacologique des fonctions de MT1-MMP	16
CHAPITRE II.....	28
PROJET DE RECHERCHE.....	28
2.1. Problématique.....	28
2.2. Hypothèses de travail	29
2.3. Objectifs de recherche	29
CHAPITRE III	30
ARTICLES.....	30
3.1. Cell-based evidence for aminopeptidase N/CD13 inhibitor actinonin targeting of MT1-MMP-mediated proMMP-2 activation.....	30
Abstract	32
Introduction	33
Materials and Methods	34
Results	37
Discussion	40
References	42
3.2. The lectin concanavalin-A signals MT1-MMP catalytic independent induction of COX-2 through an IKK γ /NF- κ B-dependent pathway	51
Abstract	53
Introduction	55
Materials and Methods	57
Results	59
Discussion	62

References	65
CHAPITRE IV	75
DISCUSSION	75
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	84
LISTE DES RÉFÉRENCES.....	85

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Les six principales propriétés acquises par les cellules cancéreuses responsables du caractère malin des tumeurs.	17
Figure 2: Les principales étapes d'initiation, de promotion et de progression de la cancérogenèse.	18
Figure 3: Les différentes étapes par lesquelles les cellules cancéreuses se propagent à partir de la tumeur primaire vers un site distant dans le corps.	19
Figure 4: La balance entre les facteurs activateurs et inhibiteurs lors du processus de l'angiogenèse.	20
Figure 5: Les événements principaux de l'angiogenèse.	21
Figure 6: Les familles de protéines NF- κ B, I κ B, et IKK.	22
Figure 7: Séquence promotrice et induction du gène Cox-2.	23
Figure 8: Classification des MMPs.	24
Figure 9: Les voies de signalisation impliquées dans le contrôle de l'expression des MMPs.	25
Figure 10: Mécanisme d'activation de la proMMP-2.	26
Figure 11: Domaines structuraux de la MT1-MMP.	27
Figure 12: Le ciblage pharmacologique de MT1-MMP et l'implication de son domaine cytoplasmique dans l'inflammation tumorale.	81
Figure 13: La structure chimique de deux inhibiteurs des MMPs appartenant à la famille d'hydroxamate.	82
Figure 14: Séquence cytoplasmique de la MT1-MMP.	83

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABC	Adenosine triphosphate-binding cassette
ADN	Acide désoxyribonucléique
AKT	Protéine kinase B
AP	Protéine activatrice
APN	Aminopeptidase N
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adenosine triphosphate
BCRP	Best cancer resistance protein
bFGF	Facteur de croissance basique des fibroblastes
CD133	Prominin-1 ou PROM1
CDKNA	Cyclin-dependent kinase inhibitor A
ConA	Concanavaline A
COX	Cyclooxygénase
CSC	Cellules souches cancéreuses
CytoD	Cytochalasine D
EGF	Facteur de croissance épidermal
ERK	Kinase régulée par des signaux extracellulaires
GBM	Glioblastome multiforme
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
I κ B	Inhibiteur kappa B
IL	Interleukine
IKK	I κ B Kinase
JAK	Janus kinase
JNK	c-jun N-terminal kinase
MAPK	Protéine kinase activée par les agents mitogènes
MDR	Protéine multi-drug resistance
MEC	Matrice extracellulaire

MEF	Cellules de fibroblaste d'embryon de souris
MMP	Métalloprotéinase matricielle
MT-MMP	Métalloprotéinase matricielle transmembranaire
NF- κ B	Facteur nucléaire-kappa B
NF-IL 6	Facteur nucléaire-interleukine 6
PDGF	Facteur de croissance dérivé de plaquettes
PGs	Prostaglandines
PTEN	Phosphatase suppresseur de tumeur
RECK	Reversion-inducing-cysteine rich protein with Kazal motifs
ROS	Espèces réactives oxygénées
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TIMP	Inhibiteurs tissulaires des MMPs
TNF	Facteur tumoral nécrotique
U87	Lignée cellulaire de glioblastome humaine
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

RÉSUMÉ

Durant la progression tumorale cérébrale, les cellules envahissent le tissu environnant, afin de s'y infiltrer. Pour ce faire, elles sécrètent ou expriment à leur surface des métalloprotéases matricielles (MMPs), capables de dégrader les composants de la matrice extracellulaire. Parmi ces MMPs, la MMP membranaire de type 1 (MT1-MMP) joue un rôle crucial dans l'acquisition du potentiel invasif des cellules tumorales cérébrales. La MT1-MMP dégrade de nombreux composants de la matrice extracellulaire et des protéines de surface. Grâce à son activité protéolytique, la MT1-MMP joue ainsi un rôle important dans les différentes étapes de la progression tumorale cérébrale incluant l'angiogenèse. Le ciblage pharmacologique des fonctions de MT1-MMP serait donc une approche thérapeutique efficace dans le traitement de gliomes. Bien que l'activité protéolytique de la MT1-MMP demeure sa fonction la plus importante, plusieurs études tendent à démontrer que la portion cytoplasmique de l'enzyme contribue à l'induction de signaux intracellulaires possiblement impliqués dans la chimio et la radio-résistance à la thérapie des gliomes. Parmi les marqueurs associés à cette résistance et surexprimés dans les gliomes hautement malins, il y a la cyclooxygénase-2 (Cox-2). Toutefois, le mécanisme moléculaire reliant l'activité intracellulaire de MT1-MMP à l'expression de Cox-2 demeure incompris.

La première partie de mon mémoire a pour objectif d'étudier le ciblage pharmacologique des fonctions de MT1-MMP par l'actinonine, un inhibiteur sélectif de l'aminopeptidase N/CD13 et des MMPs solubles, dans les cellules de glioblastome U87. Nous y montrons que l'actinonine inhibe l'activation de la proMMP-2 induite par la concanavaline-A (ConA), une condition expérimentale connue pour induire l'expression de MT1-MMP dans les cellules U87. De plus, grâce à l'analyse de l'expression génique de MT1-MMP, l'actinonine n'a pas modulé l'expression de MT1-MMP induite par la Con-A, suggérant que les effets de l'actinonine sont post-transcriptionnels. Nos résultats positionnent l'actinonine comme un possible candidat thérapeutique ciblant MT1-MMP.

La deuxième partie de mon mémoire s'est orientée sur l'axe MT1-MMP/Cox-2 dans les glioblastomes U87. Nos observations préalables d'une modulation conjointe de l'expression de MT1-MMP et de Cox-2 dans les cellules isolées de glioblastomes humains U87 induite par la ConA nous ont permis d'évaluer le rôle de la ConA dans le déclenchement des processus cellulaires pro-inflammatoires qui régulent l'expression de Cox-2. Nous avons trouvé que le traitement avec la ConA, ou la surexpression directe de MT1-MMP recombinante conduit à l'induction de Cox-2 via une voie de signalisation impliquant NF- κ B/IKK γ .

Collectivement, les résultats présentés dans ce mémoire apportent de nouvelles informations quant à l'implication du domaine intracellulaire de la MT1-MMP dans le phénotype pro-inflammatoire des cellules cancéreuses cérébrales. Ceci inspirera la conception de nouvelles stratégies de thérapie pouvant combiner l'action des inhibiteurs de MT1-MMP à celle des drogues anti-inflammatoires pour le traitement de gliomes.

Mots clés : MT1-MMP, Concanavaline-A, Actinonine, Cox-2, Inflammation, Glioblastome

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1. Le cancer

1.1.1. Généralités

Le cancer reste un grand défi en médecine de nos jours, et est en voie de devenir la première cause de mortalité au Québec et très prochainement dans le monde entier. En effet, le rapport sur les statistiques canadiennes sur le cancer estime que jusqu'à la fin de 2009, au Québec on s'attend à ce que près de 44 200 nouveaux cas de cancer (171 000 au Canada) et 20 100 décès attribuables à cette maladie (75 300 au Canada) (Statistics Canada, 13 décembre 2009). On parle même de « crise du cancer » et selon *la Société Canadienne du Cancer*, il est impératif de mettre en place une stratégie de lutte contre cette maladie. Les thérapies traditionnelles utilisées pour soigner le cancer, soient la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie, ont permis de faire de grands pas vers la réduction de la mortalité liée à de nombreux cancers. Mais la prise en charge clinique des patients cancéreux incite les chercheurs à s'engager de plus en plus afin de lutter contre le cancer en essayant de comprendre les mécanismes moléculaires qui contribuent au potentiel malin tumoral afin d'élaborer de nouvelles stratégies de traitement thérapeutiques plus efficaces.

1.1.2. La cancérogenèse

Le maintien de la structure et le fonctionnement d'un tissu sont basés sur l'équilibre entre la prolifération, la différenciation et la mort/survie cellulaire. La perte de cette homéostasie conduit à la transformation d'un tissu physiologique sain en un tissu cancéreux qui se caractérise par l'acquisition d'au moins six propriétés (Hanahan et Weinberg, 2000). 1) Indépendance vis à vis des signaux stimulant la prolifération, 2) insensibilité aux signaux inhibiteurs, 3) inhibition de l'apoptose, 4) capacité proliférative illimitée, 5) acquisition d'un potentiel invasif, et 6) disposition d'un pouvoir angiogénique (Figure 1).

Les progrès de la biologie moléculaire ont permis de proposer un modèle général de la cancérogenèse qui comprend trois étapes successives (Beckman et Loeb, 2005 ; Bignold, 2004 ; Bocchetta et Carbone, 2004 ; Kinzler et Vogelstein, 1996) (Figure 2). La première étape connue sous le nom **d'initiation**, désigne une altération au niveau du génome de la cellule sous l'action d'un facteur cancérigène. Elle consiste le plus souvent en une mutation ou délétion d'une ou plusieurs bases de l'ADN. La cellule acquiert ainsi des caractéristiques précancéreuses mais pas nécessairement transmises aux cellules filles. Dans le cas où la cellule initiée s'échappe du processus de réparation de l'ADN, elle passe à la phase de **promotion** qui correspond à la prolifération anormale des cellules initiées (clones de cellules). Cette multiplication des cellules va en augmentant parallèlement aux mutations de l'ADN qui sont des conséquences de stimuli exogènes et endogènes. Ces promoteurs tumoraux incluent l'alcool, le tabac, certaines hormones, les radiations (ultraviolets solaires), et l'alimentation (certains corps gras), et font partie des facteurs qui contribuent au développement tumoral. L'influence des facteurs de croissance cellulaires et de régulation du cycle cellulaire est également déterminante au cours de cette phase. Toutefois l'initiation et la promotion tumorale entraînent un avantage prolifératif relativement bénin. C'est dans l'étape de **la progression** de la cancérogenèse que se manifeste l'accumulation de nouvelles mutations géniques qui confèrent aux cellules tous les signes histologiques d'une tumeur maligne (Weinberg, 1989). Cette transformation maligne permet aux cellules l'acquisition d'une capacité proliférative indéfinie et une propension à se disséminer dans d'autres sites que leurs sites naturels (Gupta et Massagué, 2006).

1.1.3. La métastase

Au cours de la cancérogenèse, la tumeur acquiert une "plasticité génétique" qui lui attribue une sélectivité propre au processus métastatique (Desplaces et Poupon, 1994). Cet événement est défini comme étant la capacité des cellules tumorales à coloniser des organes à distance et à proliférer, formant ainsi de nouveaux foyers tumoraux. La dissémination métastatique est associée à l'invasion tissulaire caractérisée par la propriété des cellules individuelles ou de petits amas de cellules tumorales à traverser les espaces fluides du corps. Les voies de métastases comprennent le liquide céphalo-rachidien, le liquide péritonéal, la

lymphe, et le sang. Le système vasculaire représente la voie la plus fréquente de métastases tumorales (Crépin, 2007 ; Lee et Lim, 2007) (Figure 3) qui se manifeste par une **intravasation** des cellules tumorales dans les espaces vasculaires. Pendant l'intravasation, les cellules tumorales migrent entre les cellules endothéliales des capillaires, afin d'établir un contact direct avec le sang conduisant à leur dispersion systémique à tous les tissus du corps. Par la suite, les cellules néoplasiques s'engagent dans une seconde étape de l'invasion, **l'extravasation**, à travers laquelle elles quittent la lumière du vaisseau vers le stroma environnant. Ces étapes d'invasion, fondamentales dans la métastase, impliquent la coordination d'un certain nombre d'événements, d'adhérence cellulaire et de contractilité associée au remodelage protéolytique de la matrice extracellulaire (MEC) (Friedl et Wolf, 2003). Plusieurs enzymes protéolytiques de la MEC, y compris les protéases à cystéine, les protéases à sérine, les protéases à aspartate et les métalloprotéases matricielles (MMPs), sont surexprimées et activées lors de l'invasion tumorale (Coussens *et al.*, 2002 ; Cuvelier *et al.*, 1997 ; Zhai *et al.*, 2005). Cependant, bien que chacune de ces familles d'enzymes protéolytiques soit impliquée dans l'invasion tumorale et la formation de métastases, les MMPs représentent le groupe le plus important de ces protéases, puisque non seulement elles accomplissent la majorité de la protéolyse matricielle, mais elles agissent aussi comme des molécules régulatrices, soit en intervenant dans des cascades enzymatiques, soit en générant des facteurs favorisant l'angiogenèse et la croissance de la tumeur (Johansson *et al.*, 2000 ; Stamenkovic, 2000 ; Stetler-Stevenson et Yu, 2001). En général, la formation des foyers tumoraux secondaires souvent multiples sont le siège d'une angiogenèse active.

1.1.4. L'angiogenèse

L'angiogenèse est la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Elle joue un rôle majeur dans la croissance d'une tumeur puisque sans ce processus, la tumeur ne peut dépasser une taille de 2 à 3 mm³ par manque d'oxygène et de nutriments. De plus le processus métastatique est fortement dépendant de cette voie de dissémination (Folkman, 2002 ; Gupta et Qin, 2003).

L'angiogenèse est un phénomène complexe impliquant la prolifération et la différenciation des cellules endothéliales, ainsi que le remodelage de la MEC (D'Amore et Thompson, 1987 ; Grant *et al.*, 1989 ; Senger, 1996). Ce processus cellulaire implique l'activité fonctionnelle d'une grande variété de molécules, y compris les protéines de la MEC, les facteurs de croissance et les récepteurs d'adhérence (Blood et Zetter, 1990 ; Brooks *et al.*, 1994 ; Ingber et Folkman, 1989). Le contrôle de l'angiogenèse physiologique est le résultat d'une balance équilibrée entre les molécules activatrices et inhibitrices de l'angiogenèse (Auerbach et Auerbach, 1994 ; Hanahan et Folkman, 1996) (Figure 4). Toutefois, le dérèglement des mécanismes moléculaires qui contrôlent cet équilibre demeurent obscurs. Fait important, la néovascularisation tumorale se manifeste par une protéolyse de la MEC qui permet la migration cellulaire et la libération d'un ensemble de molécules de signalisation. En effet les MMPs sont impliquées dans ces processus en raison de leur action protéolytique sur les composantes de la MEC (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993 ; Werb, 1997). La MMP-2 et la MMP-9 sont majoritairement exprimées par les cellules endothéliales situées à l'intérieur et autour de la tumeur ainsi que par les fibroblastes du stroma péri-tumoral (Kamat *et al.*, 2006). Des études ont également montré que les MMPs de type membranaire (MT-MMP) jouent également un rôle important dans l'angiogenèse, un fait confirmé par l'action des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMP) sur la néo-angiogenèse dans des essais *in vitro* (Collen *et al.*, 2003). Les effets des MMPs sont loin de se limiter à la dégradation de la MEC (Chang et Werb, 2001). Les facteurs de croissance peptidiques séquestrés au sein des protéines de la MEC sont rendus disponibles une fois que celle-ci est dégradée par les MMPs (Mañes *et al.*, 1999). L'augmentation de la biodisponibilité de ces médiateurs directs de l'angiogenèse incluent VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire), FGF (facteur de croissance de fibroblastes) et PDGF (facteur de croissance dérivé de plaquettes), ce qui joue un rôle important dans la croissance tumorale de plusieurs types de cancers (Bergers *et al.*, 2000) (Figure 5).

Puisqu'il est maintenant bien établi que le développement d'une vascularisation est un événement clef dans le processus tumoral, autant pour la croissance des tumeurs que pour leur dissémination métastatique, cibler le processus angiogénique semble une stratégie anti-cancéreuse prometteuse (Folkman, 2003). Cette stratégie de traitement offre un vaste champ

d'application puisque la plupart des cancers sont dépendants de l'angiogenèse pour leur développement et leur survie.

Il existe actuellement de nombreux inhibiteurs angiogéniques en développement pour différents types de cancers (côlon, pancréas, rein, tumeurs stromales gastriques...). Les agents anti-angiogéniques sont classés en inhibiteurs **directs** tels que les inhibiteurs de MMPs, inhibiteurs **indirects** qui inhibent certains facteurs clés du processus angiogénique tels que le VEGF ou son récepteur, et en inhibiteurs **divers** telle que la thalidomide qui entrave le développement des vaisseaux sanguins autour de la tumeur (Mennecier, 2007). Actuellement, les agents anti-angiogéniques les plus prometteurs en essais cliniques semblent être les inhibiteurs directs. Par ailleurs, ces études cliniques ont montré que la thérapie anti-angiogénique ne permet pas malheureusement à elle seule d'éradiquer complètement les tumeurs (Ferrara et Kerbel, 2005). Cependant, plusieurs études pré-cliniques ont montré que la co-administration d'agents antiangiogéniques aux thérapeutiques cytotoxiques permettait d'augmenter l'effet anti-tumoral global du traitement (Ferrara et Kerbel, 2005). Ainsi, la thérapie anti-angiogénique pourrait être complémentaire aux traitements de chimiothérapie et de radiothérapie conventionnels.

1.1.5. L'inflammation

Les recherches réalisées au cours des deux dernières décennies ont soutenu l'idée que le développement tumoral est le résultat de processus impliquant à la fois les cellules cancéreuses et non cancéreuses avoisinantes, dans plusieurs cas la tumeur est donc hétérocellulaire. Un exemple de ceci est illustré par la nécessité de la néo-angiogenèse pour la croissance tumorale et donc la contribution des cellules endothéliales vasculaires (Folkman, 2002). Des études épidémiologiques ont montré l'existence d'un lien causal entre l'inflammation chronique et le cancer (Kuper *et al.*, 2000). Généralement, la réaction inflammatoire est une réponse immédiate stimulée par la présence d'une infection, d'une lésion ou d'une blessure, alors que les tumeurs ont été longtemps considérées comme des «plaies» qui ne guérissent pas (Dvorak, 1986). Ainsi, l'inflammation devient chronique et les cellules inflammatoires créent un microenvironnement autour de la tumeur qui contient des

cytokines pro-inflammatoires, et de chimiokines tels le TNF α , IL-1, IL-6 et IL-8, ainsi que des enzymes protéolytiques de la matrice, des facteurs de croissance et des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Coussens et Werb, 2002). Ces médiateurs pro-inflammatoires agissent via diverses voies de signalisation intracellulaires, à savoir les voies des *mitogen activated protein kinases* (MAP kinases), de la phosphoinositide (PI)-3 kinase, de *janus kinase/signal transducer and activator of transcription* (JAK/STAT) et de *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) (Drosos, 2002 ; Piecyk et Anderson, 2001) qui sont impliquées dans la prolifération cellulaire, la survie cellulaire, la migration cellulaire, l'angiogenèse, ainsi que dans le développement tumoral. Classiquement, le facteur de transcription NF- κ B est considéré comme un élément clef de la réaction inflammatoire et de nombreuses stratégies thérapeutiques basées sur l'inhibition de ce facteur sont en cours d'évaluation (Barnes et Karin, 1997).

1.1.5.1. Le rôle de la voie de signalisation NF- κ B dans la progression tumorale induite par l'inflammation

Initialement identifiée pour son rôle dans les cellules immunitaires, la famille de facteurs de transcription NF- κ B a été retrouvée dans à peu près tous les types cellulaires et joue un rôle primordial dans le contrôle d'une variété de processus biologiques, parmi lesquels la prolifération cellulaire, l'adhésion cellulaire, le remodelage tissulaire et la survie cellulaire (Ghosh *et al.*, 1998). Des études récentes utilisant un modèle de colite associée au cancer ont fourni des preuves sur le rôle de NF- κ B dans la carcinogenèse et l'effet de l'inflammation dans la promotion du cancer (Karin, 2006).

La famille de NF- κ B est composée de cinq sous-unités: NF-kappaB1 (p50 et son précurseur p105), NF-kappaB2 (p52 et son précurseur p100), c-Rel, RelA (p65) et RelB. Les protéines NF- κ B sont des activateurs transcriptionnels présents dans la cellule sous forme d'homo-dimères et hétéro-dimères qui partagent un domaine d'homologie N-terminal Rel, ce dernier contient la séquence de liaison à l'ADN (Widera *et al.*, 2006). Le dimère le plus fréquent est formé de p50/p65, mais il existe d'autres combinaisons entre les différentes sous-unités. Les complexes NF- κ B sont normalement conservés dans le cytoplasme dans un état

inactif par interaction avec des protéines inhibitrices de la famille I- κ B. Cette famille est composée de plusieurs protéines soient I- κ B α , I- κ B β , I- κ B ϵ , I- κ B γ (p105) et I- κ B ζ (p100) (Hoffmann *et al.*, 2002). En réponse à une grande variété de stimuli, tels que les cytokines pro-inflammatoires (TNF α et IL-1), les lipopolysaccharides bactériens, les protéines virales, les esters de phorbol et divers signaux de stress (radicaux libres et radiations), les protéines inhibitrices I- κ B sont phosphorylées, par un complexe de kinases composé de trois sous-unités : deux sous-unités catalytiques à activité sérine/thréonine kinase (IKK α et IKK β) et une sous-unité régulatrice NEMO/IKK γ (Weil et Israel, 2006) (Figure 6). Bien que les données actuelles montrent que le complexe oligomérique IKK puisse être constitué généralement de l'hétérodimère IKK α et IKK β , des variantes mineures du complexe IKK peuvent exister et impliquer la forme homodimère de IKK α ou IKK β (Krappmann *et al.*, 2000). La phosphorylation de I- κ B entraîne l'ubiquitination et finalement sa dégradation par le protéasome 26S. Cette dégradation permet aux dimères p50/p65 d'être transloqués dans le noyau et d'activer la transcription de gènes cibles spécifiques dont les protéines aux fonctions anti-apoptotiques (Magné *et al.*, 2004). Cette faculté à promouvoir la survie cellulaire a confirmé l'intérêt déjà porté à NF- κ B en cancérologie. De plus, NF- κ B contrôle la prolifération cellulaire à travers l'expression de gènes codant pour des facteurs de croissance tels que IL-2, G-CSF et GM-CSF ou de régulateurs du cycle cellulaire tels la cycline D1 et c-myc (Sirvent *et al.*, 2003). La famille NF- κ B participe à la néo-angiogenèse via l'expression de l'IL-8 et du VEGF et peut favoriser la dissémination métastatique par l'induction de MMPs (Sirvent *et al.*, 2003). Il est également considéré comme un facteur de résistance à la chimiothérapie par l'induction de l'expression de MDR (protéine *Multi-Drug Resistance*) (Baldwin, 2001). En outre, des études ont montré le rôle du facteur de transcription NF- κ B dans le contrôle de l'expression d'un autre modulateur pro-inflammatoire soit la cyclooxygénase-2 (Cox-2) qui est impliqué dans la transformation et l'évolution de la malignité tumorale de plusieurs types de cancers (Williams *et al.*, 2000). Une activation constitutive de NF- κ B apparaît donc en mesure d'induire ou de conforter chacune des caractéristiques fondamentales d'une cellule cancéreuse dans plusieurs types de tumeurs solides et d'hémopathies malignes telles la maladie de Hodgkin, la leucémie lymphoïde chronique, la leucémie aiguë myéloblastique, le neuroblastome, le cancer du sein et du cerveau (Karin *et al.*, 2002).

1.1.5.2. La contribution de la protéine pro-inflammatoire Cox-2 dans la carcinogénèse

Depuis la fin des années 1970, les chercheurs se sont intéressés à savoir si la prise régulière des médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens peut réduire le risque de cancer par l'inhibition de la synthèse des prostaglandines (PGs). Effectivement, il apparaît que cet effet soit observé dans le cas du cancer du côlon (Tsujil *et al.*, 1998). Les cyclo-oxygénases (Cox) sont des enzymes clés impliqués dans la synthèse d'une variété de PGs. Les Cox existent dans les cellules sous deux isoformes : Cox-1 et Cox-2, avec une structure et une fonction très semblable. Elles possèdent un site spécifique de fixation de l'acide arachidonique permettant la production de PGs mais elles sont codées par des gènes différents (Smith *et al.*, 2000). En effet le gène de Cox-1 est situé sur le chromosome 9 alors que celui de Cox-2 est situé sur le chromosome 1. Cox-1 est exprimée de façon constitutive dans la plupart des tissus et semble être responsable de la production des PGs qui interviennent dans les fonctions physiologiques. Par contre, Cox-2 n'est observée que dans certains tissus tels que le cerveau, l'estomac, les reins et l'endothélium vasculaire (Kolaczowska *et al.*, 2009). Son expression est induite par des cytokines, des facteurs de croissance, des mitogènes et des promoteurs de tumeurs. Elle contribue à la synthèse des PGs dans des tissus inflammés et néoplasiques. De plus, le promoteur du gène de Cox-2 possède plusieurs éléments de réponse à des facteurs de transcription dont AP-2, NF-IL6 et NF- κ B (Yamamoto *et al.*, 1998) (Figure 7). L'élément de réponse à NF- κ B est localisé à deux sites consensus dans la région promotrice du gène de Cox-2 : le site de NF- κ B 5' (5'-GGCGGGAGA TGCGCCCC-3') situé entre -455 à -428 bases à partir du site d'initiation de la transcription et le site NF- κ B 3' (5'-CAGGAGAGT CCCTCTGCT-3') situé dans un interval de -232 à -205 bases à partir du site de début de la transcription (Appleby *et al.*, 1994). NF- κ B 5' a été démontré avoir un rôle dans le mécanisme d'induction de Cox-2 par TNF α (facteur de nécrose tumorale) dans une lignée cellulaire d'ostéoblastes murins (Yamamoto *et al.*, 1995). Alors que NF- κ B 3' peut jouer un rôle dans l'induction de Cox-2 par les lipopolysaccharides et l'ester de phorbol de concert avec le NF-IL-6 (Inoue *et al.*, 1995).

De ce fait, la surexpression de Cox-2 qui peut être induite par une stimulation transcriptionnelle constitutive de NF- κ B est observée dans plusieurs types de néoplasies notamment des cancers du larynx, de la cavité buccale et du pharynx, de l'œsophage, du pancréas, des reins, de la vessie et du poumon (Shishodia et Aggarwal, 2004). De plus, il se trouve qu'une augmentation de l'expression de Cox-2 au sein des gliomes est corrélée avec le grade tumoral des gliomes (Castelli *et al.*, 1989 ; Paoletti *et al.*, 1989 ; Temel et Kahveci, 2010). Enfin, des travaux effectués dans notre laboratoire ont démontré l'existence d'un axe de signalisation MT1-MMP/Cox-2 dans les cellules souches CD133(+) enrichies d'une lignée cellulaire de tumeur cérébrale, suggérant que les MMPs sont liées à Cox-2 dans la médiation de la cancérogenèse (Annabi *et al.*, 2009).

1.2. Les métalloprotéinases de la matrice extracellulaire

1.2.1. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est une structure complexe composée en grande partie de collagènes, de glycoprotéines et de protéoglycanes (Timpl et Brown, 1996). Ces molécules ont un rôle de soutien structurel pour les cellules de même qu'un rôle biochimique de signalisation (Coussens et Werb, 1996 ; Egeblad et Werb, 2002). Au niveau de la MEC se trouvent également plusieurs facteurs et inhibiteurs de croissance, souvent liés aux différents collagènes. La MEC est constamment renouvelée et subit de profonds remaniements au cours de phénomènes physiologiques tels que la morphogenèse (incluant l'angiogenèse), la cicatrisation, l'ossification, le cycle menstruel et l'involution des glandes mammaires post-lactation (Vu et Werb, 2000). La modulation de la disponibilité et les niveaux des molécules de la MEC peut avoir des conséquences importantes dans diverses pathologies telles que la sclérose en plaques, la maladie d'Alzheimer et le développement de cancers (Forget *et al.*, 1999). Parmi les enzymes protéolytiques essentielles impliquées dans la dégradation de la MEC, on trouve les MMPs. Au début des années 70, la corrélation entre l'expression d'une activité protéolytique des MMPs et la capacité invasive ainsi que la croissance des cellules tumorales était déjà bien établie.

1.2.2. Classification et structure des MMPs

Comme leur nom l'indique, les MMPs représentent une grande famille d'enzymes protéolytiques qui nécessitent la présence d'un ion métallique (zinc et calcium) pour leur activité enzymatique. Les MMPs peuvent être classées en 6 sous-familles en fonction de leurs différences structurales : les matrilysines, les collagénases interstitielles, les stromélysines, les gélatinases, les MMPs de type membranaire et enfin la sixième sous-famille qui forme un groupe hétérogène (Nelson *et al.*, 2000) (Figure 8). Les MMPs possèdent des structures dont les séquences présentent certaines homologies qui sont conservées entre elles. Toutes les MMPs possèdent à leur extrémité N-terminale un pré-domaine, nécessaire à leur transport intracellulaire jusqu'à la surface cellulaire qui est éliminé au cours de leur synthèse dans le réticulum endoplasmique (Bode *et al.*, 1999). Ce pré-domaine est suivi d'un pro-domaine responsable du maintien des MMPs sous forme inactive grâce à une séquence peptidique comprenant un résidu cystéine qui interagit avec le site catalytique des MMPs (Van Wart et Birkedal-Hansen, 1990). Ce dernier est caractérisé par une séquence qui contient trois résidus histidines qui chélatent l'atome de zinc du site actif (Massova *et al.*, 1998). À l'exception de la MMP-7 et de la MMP-26 (matrilysine-1 et -2), la plupart des MMPs possèdent un quatrième domaine C-terminal, hémapexine-like, qui présente une similarité structurale avec l'hémapexine et la vitronectine (Murphy et Docherty, 1992). Ce domaine est responsable de la liaison des MMPs à leurs substrats, ainsi qu'aux inhibiteurs tissulaires des MMPs (TIMPs) (Stamenkovic, 2000). Il a été démontré que l'activation de la proMMP-2 se fait via l'interaction de son domaine C-terminal avec la MT1-MMP, ainsi que son interaction avec TIMP-1 et TIMP-2 (Murphy et Docherty, 1992). Le domaine hémapexine est relié au domaine catalytique par une région charnière riche en résidus prolines qui semble influencer également la liaison des MMPs à leurs substrats (Nagase et Woessner, 1999). En outre, la gélatinase A (MMP-2) et B (MMP-9) contiennent, de plus, un domaine de type II de la fibronectine relié à leur domaine catalytique permettant à ces gélatinases de dégrader le collagène et l'élastine (Cuvelier *et al.*, 1997 ; Nagase et Woessner, 1999).

Ainsi, toutes les MMPs sont sécrétées dans le milieu extracellulaire, excepté six d'entre-elles qui sont ancrées dans la membrane plasmique grâce à un domaine transmembranaire

localisé à leur extrémité C-terminale suivie par un court domaine cytosolique qui sert pour la transduction de signal intracellulaire (Stocker *et al.*, 1995). En raison de leur localisation membranaire, ces enzymes jouent un rôle unique par rapport aux MMPs sécrétées dans la dégradation localisée de la MEC. En effet, la MT1-MMP est une des MMPs membranaires la plus étudiée comme contributeur au processus d'invasion tumorale et dans la formation de métastases (Nakada *et al.*, 2001). Il a été aussi démontré que la MT1-MMP participe aux mécanismes impliqués dans la résistance à la chimiothérapie et à la radiothérapie dans les cellules tumorales cérébrales (Wild-Bode *et al.*, 2001).

1.2.3. Expression et régulation de MT1-MMP

1.2.3.1. L'expression génique

Les MMPs sont généralement exprimées à des niveaux très bas dans les cellules saines. Toutefois, lors des circonstances physiopathologiques qui exigent le remodelage de la MEC, le niveau d'expression des MMPs peut être induit (Kähäri et Saarialho-Kere, 1999). L'expression de la majorité des gènes des MMPs est induite par des facteurs de croissance tels le facteur de croissance de l'épiderme (EGF), par des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α et l'interleukine 1 bêta (IL-1 β), et par des esters de phorbol (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993). Ces médiateurs entraînent l'activation des voies de signalisation intracellulaire, I κ B kinase et MAP kinase, aboutissant au recrutement nucléaire de différents facteurs transcriptionnels tels AP-1 ou NF- κ B (Firestein et Manning, 1999 ; Ninomiya-Tsuji *et al.*, 1999) qui vont réguler à la hausse la transcription des MMPs (Figure 9). En effet, il a été démontré que la stimulation de la voie NF- κ B par TNF- α induit l'expression de MT1-MMP dans les fibroblastes dermiques humains (Han *et al.*, 2001b). De plus, une surexpression de MT1-MMP dans les cellules endothéliales stimulées par les facteurs pro-angiogéniques tels le VEGF et le TNF- α confirme le rôle de cette protéine dans les mécanismes d'angiogenèse et de croissance tumorale (Lafleur *et al.*, 2002). Jusqu'à présent, MT1-MMP est la seule MMP qui est rigoureusement coexprimée avec la MMP-2 et le TIMP-2 (Sternlicht et Werb, 2001), principalement au niveau des cellules stromales (Okada *et al.*, 1995 ; Polette *et al.*, 1997). Cette coexpression concorde avec l'activation de la proMMP-2,

ce qui suggère un rôle essentiel pour la MT1-MMP dans l'invasion tumorale et les métastases (Genis *et al.*, 2006).

1.2.3.2. Le rôle classique de MT1-MMP : l'activation de la proMMP-2

La plupart des MMPs sont des enzymes protéolytiques synthétisées sous forme de zymogènes inactifs. Leur activation nécessite le clivage de leur prodomaine par des protéinases et peut être inhibée par différents inhibiteurs tissulaires des MMPs (TIMP). Un déséquilibre en faveur de la forme active versus la forme latente de la MMP-2 est corrélé avec le phénotype invasif de divers cancers (Azzam *et al.*, 1993 ; Brown *et al.*, 1993). L'activation de la MMP-2 est uniquement observée à la membrane plasmique des cellules et fait intervenir la MT1-MMP. Le processus d'activation est basé sur la formation d'un complexe trimoléculaire entre MT1-MMP, TIMP-2 et proMMP-2 qui se forme à la surface des cellules (Figure 10). Dans un premier temps, MT1-MMP se lie via son domaine catalytique au domaine N-terminal de TIMP-2. Le complexe MT1-MMP/TIMP-2 sert alors de récepteur pour proMMP-2 (Butler *et al.*, 1998). En fait, l'interaction entre ces deux molécules s'accomplit via le domaine C-terminal du TIMP-2 et le domaine hémapexine de proMMP-2. Une fois le complexe MT1-MMP/TIMP-2/proMMP-2 formé, une deuxième molécule de MT1-MMP avoisinante active et libre, clive proMMP-2 au site Asn³⁷-Leu³⁸ de son prodomaine. Dans un deuxième temps, la liaison Asn⁸⁰-Tyr⁸¹ du prodomaine de MMP-2 est clivée soit par auto-clivage, soit par action de la plasmine (Baramova *et al.*, 1997) ou d'autres MMPs actives (MMP-1, -2 et -7), afin de générer la forme active de la MMP-2 (Strongin *et al.*, 1995).

Dans ce mécanisme, TIMP-2 joue un rôle d'activateur et non d'inhibiteur en agissant comme une molécule adaptatrice. En effet, la concentration péricellulaire de TIMP-2 semble décisive pour l'activation de la proMMP-2 par MT1-MMP, puisque l'activation de proMMP-2 n'est possible qu'à de faibles concentrations de TIMP-2, suffisantes pour la formation du complexe trimoléculaire MT1-MMP/TIMP-2/proMMP-2, tandis qu'un excès de TIMP-2 peut saturer toutes les MT1-MMP requises pour la protéolyse de proMMP-2 (Butler *et al.*, 1998 ; Lafleur *et al.*, 2003) (Figure 10). Néanmoins, certains agents tels que la

Concanavaline-A (Con-A), une lectine végétale (Yu *et al.*, 1995), les esters de phorbol (Lohi et Keski-Oja, 1995), la Cytochalasine-D (Cyto-D), un agent perturbateur de cytosquelette (Ailenberg et Silverman, 1996 ; Tomasek *et al.*, 1997), sont impliqués dans l'activation de proMMP-2, mais cet effet est simplement lié à une augmentation de l'expression de la MT1-MMP (Murphy *et al.*, 1999).

En principe, MT1-MMP est synthétisée sous une proforme de 66 kDa qui est activée de façon constitutive en une forme de 60 kDa durant son transit dans le Golgi. Il a été également montré que MT1-MMP sous forme active peut subir un auto-clivage menant à une forme inactive de 43 kDa (Lehti *et al.*, 1998) (Figure 11). Cette forme est retrouvée dans plusieurs types cellulaires qui expriment l'enzyme constitutivement ou suite à l'expression de MT1-MMP recombinante (Osenkowski *et al.*, 2004). Puisque l'expression de la forme de 43 kDa est augmentée de façon significative dans les conditions où l'activation de proMMP-2 est stimulée (Annabi *et al.*, 2001 ; Gingras *et al.*, 2000), la présence de cette forme a été associée à une augmentation de l'activité de MT1-MMP (Lehti *et al.*, 1998 ; Osenkowski *et al.*, 2004). En plus d'être un activateur de proMMP-2, MT1-MMP est également une enzyme dégradant un large éventail de protéines de la MEC incluant la fibrine (Hiraoka *et al.*, 1998), les collagènes de type I, II et III, les laminines 1 et 5, la vitronectine et la fibronectine (Annabi *et al.*, 2005 ; D'Ortho *et al.*, 1997 ; Ohuchi *et al.*, 1997).

1.2.4. Inhibiteurs biologiques et synthétiques des MMPs

1.2.4.1. Inhibiteurs endogènes

À part l' α 2-macroglobuline, qui peut inhiber de façon non spécifique les MMPs dans le plasma, les TIMPs sont des inhibiteurs tissulaires clé des MMPs. Il existe actuellement quatre membres de la famille TIMP (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 et TIMP-4), chacun présentant une régulation transcriptionnelle, des propriétés biochimiques et un trait structural distinctifs. À l'exception de TIMP-3, qui est séquestrée dans la membrane plasmique, les trois autres TIMPs (TIMP-1, TIMP-2 et TIMP-4) sont sécrétées par de nombreux types cellulaires tels que les kératinocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales et par plusieurs lignées cellulaires tumorales telles les cellules d'adénocarcinomes pulmonaires, les cellules de

mélanomes humains et les cellules de lymphomes. Les TIMPs sont capables d'inhiber les MMPs avec un certain degré de spécificité. Les TIMP-1 et TIMP-2 peuvent se complexer à la proMMP-9 et la proMMP-2 respectivement. Ces deux TIMPs se lient spécifiquement aux progélatinases par leurs domaines C-terminal et le complexe TIMP-1/MMP-9 ou TIMP-2/MMP-2 est capable d'inhiber d'autres MMPs. Par ailleurs, TIMP-3 inhibe l'activité de MMP-1, -2, -3, -9 et -13 et TIMP-4 inhibe l'activité de MMP-1, -2, -3, -7 et -9 (Apte *et al.*, 1995 ; Knäuper *et al.*, 1996). Il est clair que l'équilibre entre les MMPs et les TIMPs semble critique pour l'activité des MMPs et dans la dégradation de la MEC subséquente.

Étant donné que la MT1-MMP est exprimée à la surface cellulaire sous une forme active (Jiang *et al.*, 2001 ; Toth *et al.*, 2002), la régulation de son activité est une étape critique qui fait intervenir des mécanismes différents des autres membres de la famille des MMPs. En effet, de récentes observations ont montré l'existence d'un autre régulateur négatif de la MT1-MMP nommé RECK (*reversion-inducing-cysteine rich protein with Kazal motifs*), une glycoprotéine ancrée à la membrane par un groupement GPI (Oh *et al.*, 2001). RECK intervient dans la régulation de l'internalisation de MT1-MMP au niveau de vésicules d'endocytose. Ainsi, l'activité de MT1-MMP est diminuée suite à une limitation de celle-ci à la surface cellulaire. Des souris déficientes pour RECK présentent une dégradation excessive de la MEC aboutissant à une déstabilisation des vaisseaux en formation et à une létalité embryonnaire (Oh *et al.*, 2001).

1.2.4.2. Inhibiteurs synthétiques

Le rôle important des MMPs dans la progression tumorale en a fait une cible thérapeutique anticancéreuse. Plusieurs inhibiteurs synthétiques des MMPs ont été développés durant ces dernières années afin de contrôler la formation de métastases et l'angiogenèse tumorale. La plupart de ces inhibiteurs ont la caractéristique de porter un acide hydroxamique, un acide carboxamique, phosphonamidate, thiol ou autres groupes fonctionnels qui chélatent le Zn^{2+} du site catalytique des MMPs, ce qui entraîne leur inhibition. Certains de ces inhibiteurs tels que batimastat (BB94) et Marimastat (BB2516), inhibiteurs hydroxamates, ont été développés pour cibler un large spectre des MMPs.

D'autres inhibiteurs synthétiques des MMPs ont été développés avec un profil plus sélectif d'inhibition. Des tests sur des modèles tumoraux primaires de divers cancers humains (côlon, pancréas, sein, prostate, ovaire, foie, poumon, gliome, mélanome) menés avec les inhibiteurs synthétiques des MMPs ont démontré une inhibition de l'angiogenèse, une réduction de l'invasion locale et de la croissance tumorale avec une augmentation de la mort cellulaire. En outre, lorsque ces inhibiteurs sont co-administrés avec des agents cytotoxiques comme le carboplatine et le taxol, l'efficacité du traitement est plus élevée par rapport au médicament seul, démontrant l'utilité de la thérapie par combinaison contre la croissance tumorale (Drummond *et al.*, 1999 ; Shalinsky *et al.*, 1999). Bien que les résultats obtenus avec ces inhibiteurs dans des expériences précliniques sont encourageants, l'effet secondaire majeur de la plupart de ces médicaments chez l'homme tels que la douleur musculo-squelettique dans les articulations causée par l'inflammation et la fibrose a été observé dans des cas de cancers avancés. En effet, cette toxicité a été initialement décrite lors de l'administration prolongée de Marimastat (Wojtowicz-Praga *et al.*, 1998). Ainsi, le développement de nouveaux inhibiteurs synthétiques qui ciblent de façon plus sélective les MMPs impliqués dans la promotion du cancer, à savoir la MMP-2, MMP-9 et les MT-MMPs, pourrait être plus avantageux pour le traitement du cancer.

1.3. Glioblastomes et thérapies

1.3.1. Glioblastomes

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, les cancers cérébraux primitifs relatifs aux gliomes sont classés en quatre grades. Ce système de gradation, correspond à une échelle de malignité qui constitue actuellement l'outil pronostique le plus fiable. Les glioblastomes multiformes (GBM) sont des tumeurs astrocytaires malignes de grade IV les plus fréquentes chez l'adulte, ils représentent 50% des cas de gliomes (Grossman et Batara, 2004). L'espérance de vie moyenne d'une personne diagnostiquée pour un GBM est de 9 à 15 mois (Grossman et Batara, 2004). Dix pourcents des GBM secondaires se développent à partir d'un astrocytome diffus de grade II, alors que la majorité des GBM apparaît en tant que tumeurs primaires (Tysnes et Mahesparan, 2001). Les anomalies génétiques qui caractérisent la tumorigenèse des GBM primaires et secondaires sont variées. Les GBM secondaires sont

fortement marqués par une mutation ou une délétion du gène suppresseur de tumeur p53 (Nozaki *et al.*, 1999) alors que les GBM primaires, dit « *de novo* », présentent une biologie différente avec des altérations multiples, notamment celle d'un autre gène suppresseur de tumeur CDKNA (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) et surtout de la phosphatase suppresseur de tumeur PTEN (Nozaki *et al.*, 1999). La majorité de GBM exprime également des niveaux élevés de VEGF avec une corrélation forte entre le VEGF et les niveaux d'expression de gène MT1-MMP. Un double immunomarquage a montré que le VEGF et MT1-MMP sont co-localisés dans des tumeurs de GBM humains et des cellules endothéliales.

Le traitement de ces tumeurs repose sur l'ablation de la masse cancéreuse, lorsqu'elle est possible, sur la radiothérapie et sur la chimiothérapie (Gilbert et Loghin, 2005). Cependant, ces options thérapeutiques ont malheureusement un impact limité à cause de la nature infiltrante et agressive de la tumeur (Fujimaki, 2005 ; Gilbert et Loghin, 2005). Ainsi, un ciblage spécifique des molécules impliquées dans les signatures de malignité de GBM pourrait être une nouvelle approche thérapeutique qui améliorera la survie des patients atteints de GBM.

1.3.2. Ciblage pharmacologique des fonctions de MT1-MMP

Les rôles cruciaux qu'exerce MT1-MMP à différents niveaux de la progression tumorale, ainsi que son implication dans la résistance à la chimiothérapie et la radiothérapie, font de cette enzyme une cible thérapeutique pour le développement de médicaments anticancéreux. Malgré tous les efforts déployés par l'industrie pharmaceutique à cet égard, les résultats d'essais cliniques impliquant les inhibiteurs de MMPs n'ont pas été concluants. Sur cette base, le ciblage sélectif des fonctions de MT1-MMP ne pourrait être efficace sans acquérir une connaissance approfondie des mécanismes moléculaires impliqués. Bien que les mécanismes exacts impliqués dans ces effets ne soient pas encore bien élucidés, ils pourraient impliquer l'inhibition de l'activité protéolytique extracellulaire de la MT1-MMP ou bien son domaine cytoplasmique responsable de la transduction de signaux intracellulaires.

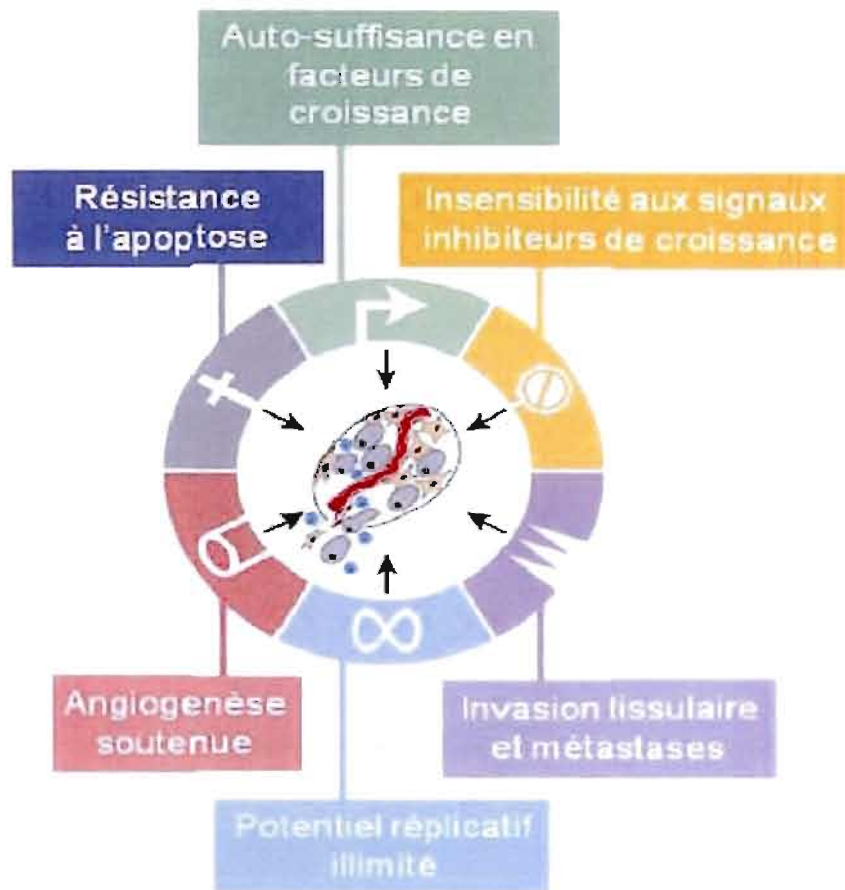


Figure 1: Les six principales propriétés acquises par les cellules cancéreuses responsables du caractère malin des tumeurs. Les cellules cancéreuses sont caractérisées par six altérations essentielles de leur physiologie, soit la résistance à l'apoptose, l'auto-suffisance en facteurs de croissance, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance, l'invasion tissulaire et les métastases, le potentiel réplcatif illimité et l'angiogenèse soutenue (Adaptée de Hanahan et Weinberg, 2000).

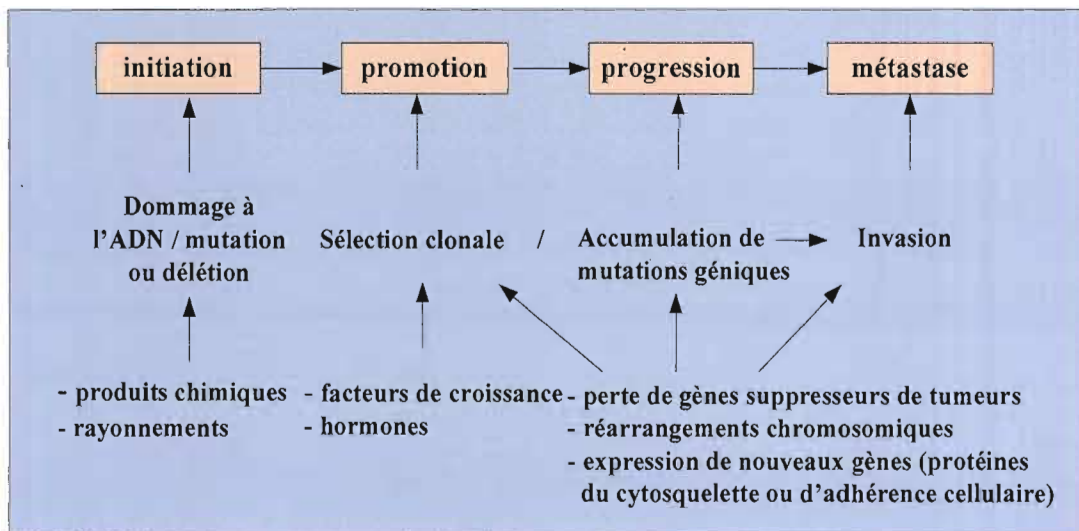


Figure 2: Les principales étapes d'initiation, de promotion et de progression de la cancérogenèse. Le concept de cancérogenèse est un processus multi-étapes : 1) l'étape d'initiation qui désigne une altération au niveau du génome de la cellule sous l'action d'un facteur cancérigène, elle consiste le plus souvent en une mutation ou délétion d'une ou plusieurs bases de l'ADN, 2) ensuite l'étape de promotion qui est un processus par lequel les cellules initiées sont exposées à un promoteur tumoral (facteurs de croissance ou certaines hormones) et subissent une expansion clonale. Cette multiplication des cellules va en augmentant parallèlement aux mutations de l'ADN, 3) et enfin la progression où se manifeste l'accumulation de nouvelles mutations géniques qui confèrent aux cellules tous les signes histologiques d'une tumeur maligne. Cette transformation maligne permet aux cellules l'acquisition d'une capacité proliférative indéfinie et un potentiel invasif vers d'autres sites que leurs sites naturels.

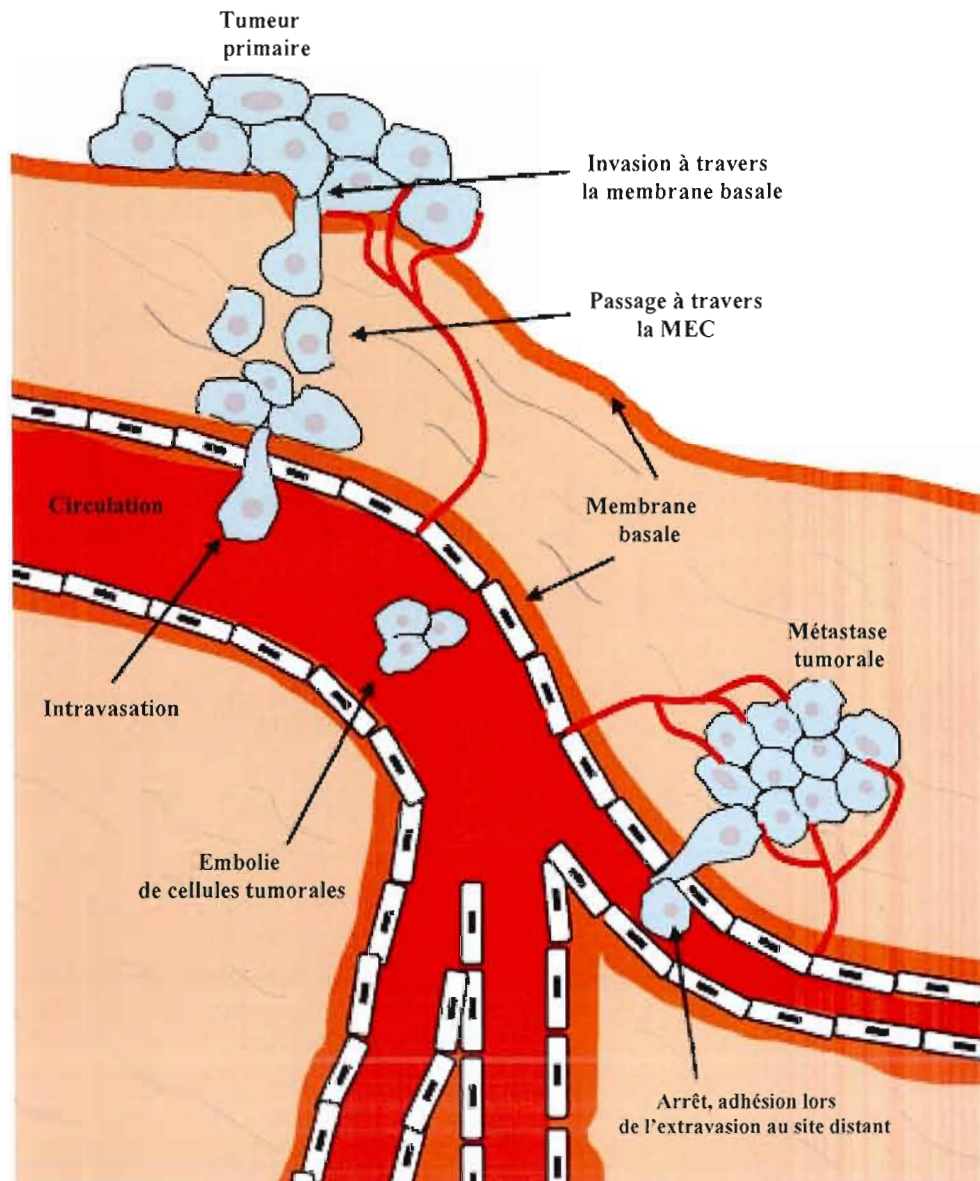


Figure 3: Les différentes étapes par lesquelles les cellules cancéreuses se propagent à partir de la tumeur primaire vers un site distant dans le corps. Le processus de métastase implique l'intravasation des cellules tumorales dans la circulation sanguine, et leur extravasation et la colonisation des organes distants (Lee et Lim, 2007).

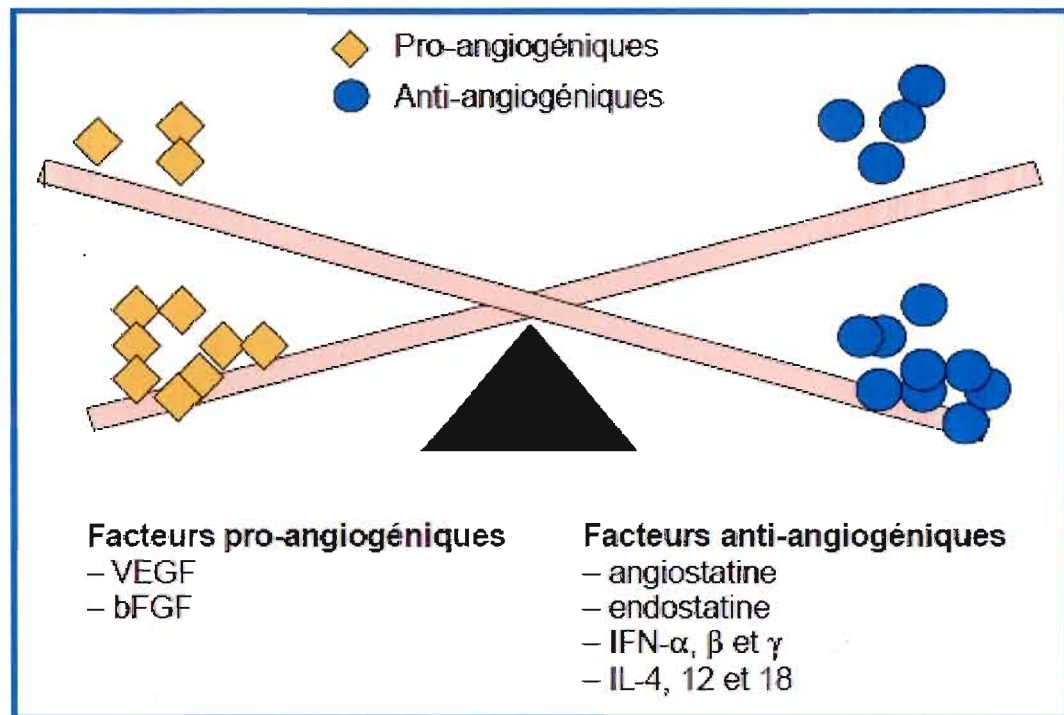


Figure 4: La balance entre les facteurs activateurs et inhibiteurs lors du processus de l'angiogenèse. Au plan moléculaire, le processus angiogénique est finement contrôlé par une balance d'inducteurs et d'inhibiteurs produits par des cellules normales ou tumorales. Dans les tissus sains, il existe un équilibre entre les facteurs pro-angiogéniques (VEGF et bFGF) et anti-angiogéniques (angiostatine, endostatine, interféron- α , β et γ , et certaines interleukines telles IL-4, 12 et 18). Ces derniers sont sous-exprimés, surexprimés ou dérégulés dans les processus tumoraux ce qui permet d'induire une angiogenèse excessive.

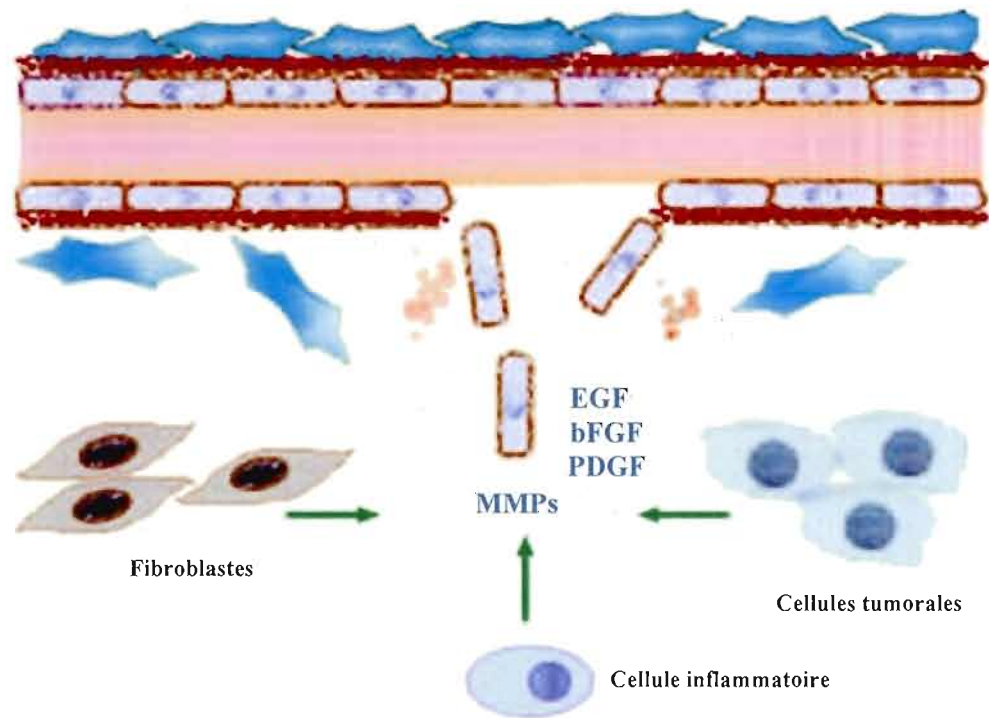


Figure 5: Les événements principaux de l'angiogenèse. Les cellules tumorales ainsi que les cellules qui entourent la tumeur (les cellules endothéliales, inflammatoires et les fibroblastes) surexpriment des métalloprotéases matricielles (MMPs) qui agissent sur la dégradation de la membrane basale vasculaire. De plus, une biodisponibilité des facteurs de croissance (VEGF, bFGF, PDGF) induit la prolifération des cellules endothéliales ce qui accentue le phénomène de l'angiogenèse.

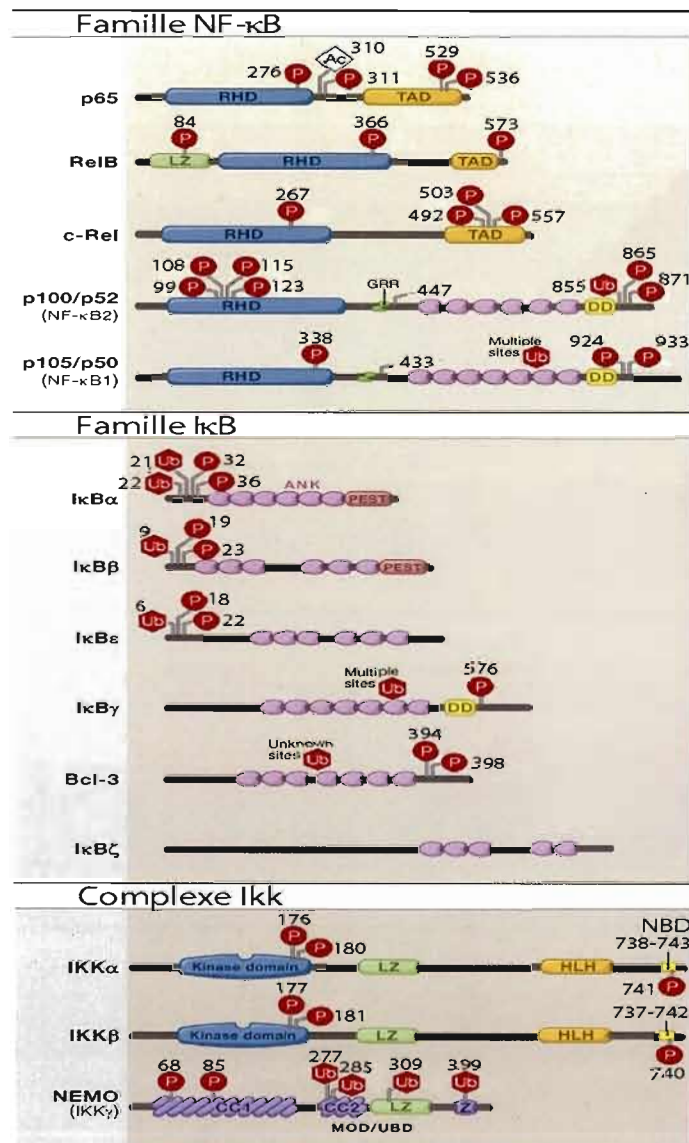


Figure 6: Les familles de protéines NF- κ B, I κ B, et IKK. Les membres de NF-kappa B, I- κ B, et les protéines IKK sont illustrés. Les modifications post-traductionnelles qui influence l'activité de IKK ou l'activation transcriptionnelle sont indiquées par P, U ou Ac pour la phosphorylation, l'ubiquitination ou acétylation, respectivement. Les inhibiteurs et les sites de phosphorylation et ubiquitination sur p100, p105, et les protéines I- κ B qui modulent la dégradation par le protéasome sont indiqués avec Ps et Us, respectivement. RHD, domaine d'homologie Rel; TAD, le domaine de la transactivation; LZ, domaine leucine zipper; GRR, région riche en glycine; HLH, domaine hélice-boucle-hélice; Z, domaine en doigt de zinc; CC1/2, coiled-coil domains; NBD, NEMO-binding domain; MOD / UBD, le domaine d'oligomérisation minimal et ubiquitine-binding domain; et DD, domaine de mort (Hayden et Ghosh, 2008).

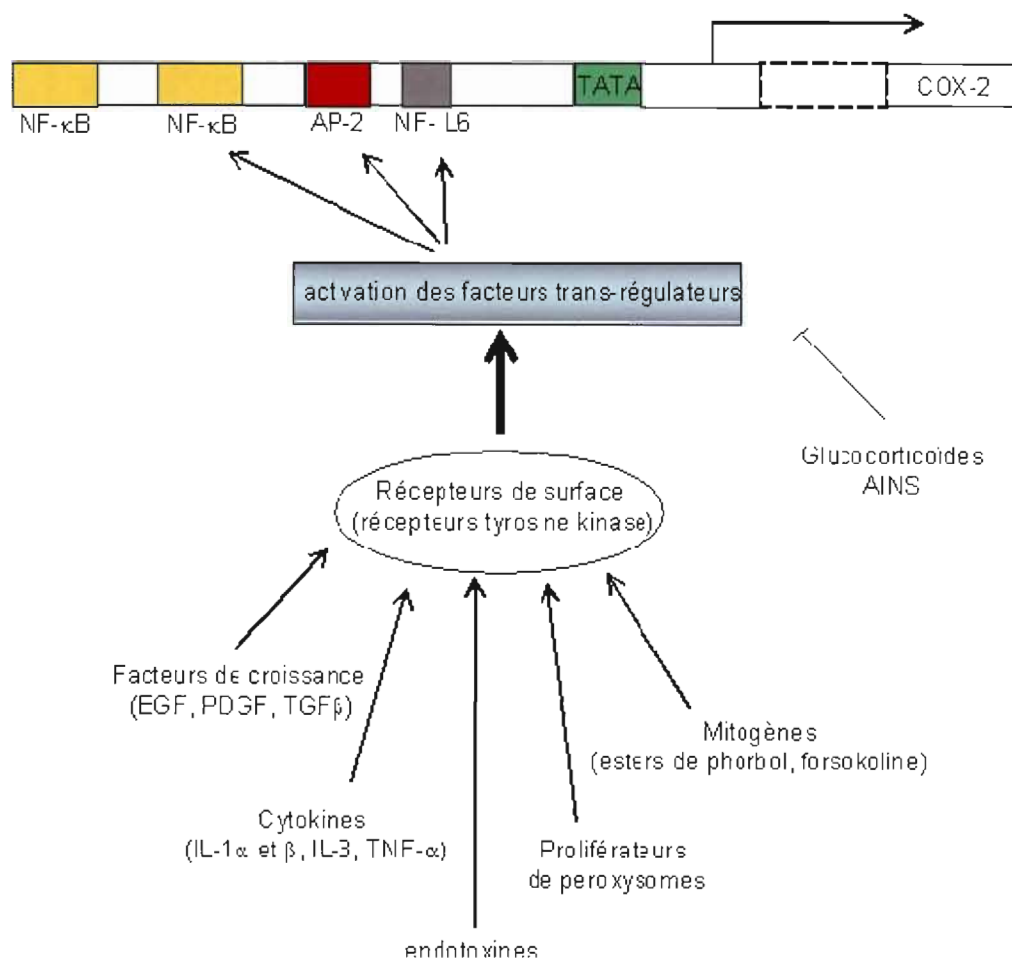


Figure 7: Séquence promotrice et induction du gène Cox-2. Cette isoforme est induite par un grand nombre de facteurs comme les facteurs de croissance (EGF : «epidermal growth factor», PDGF : «platelet derived growth factor», TGFβ : «transforming growth factor β»), les cytokines (IL-1α et β, IL-3, TNFα), les mitogènes (esters de phorbol, forskoline), les proliférateurs de peroxyosomes ou les endotoxines (Yamamoto et *al.*, 1998).

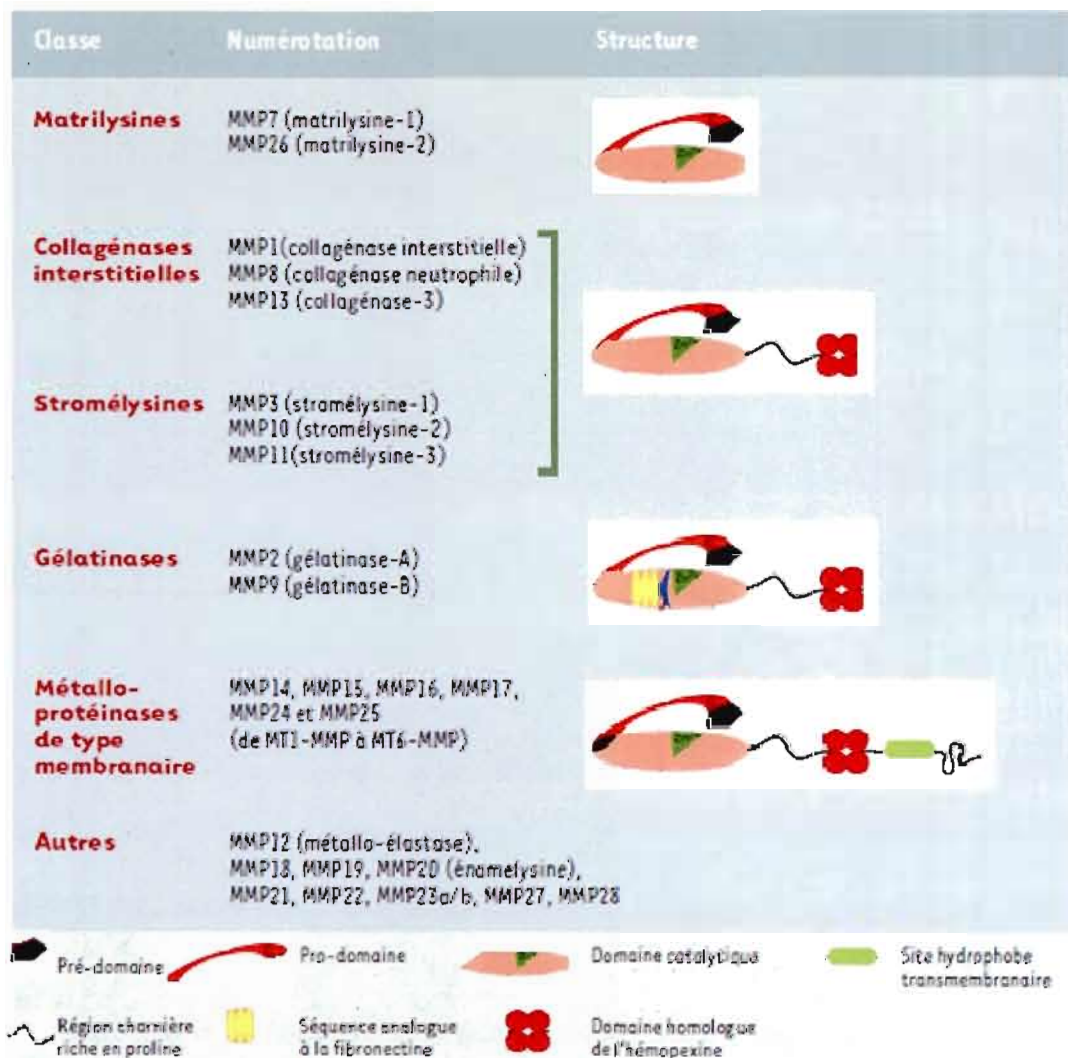


Figure 8: Classification des MMPs. Les MMPs sont group  es en six classes en fonction de leur structure. Toutes les MMPs possèdent au moins trois domaines structuraux distincts : un pré-domaine, qui permet aux MMPs d'être s  cr  t  es dans le milieu extracellulaire; un pro-domaine, qui contient une cystéine libre permettant le maintien des MMPs sous leur forme latente et dont le clivage est requis pour l'activation de l'enzyme; un domaine catalytique, qui renferme le site actif de MMPs. La plupart des MMPs possèdent également un domaine hémopexine, qui est impliqué dans la liaison des MMPs à leur substrat. De plus, certaines MMPs contiennent d'autres domaines tels 1) le domaine transmembranaire permettant la localisation des MT-MMP à la membrane cellulaire; 2) un domaine de type II de la fibronectine impliqué également dans la reconnaissance des substrats (Adapt  e de Chantrain et DeClerck, 2002).

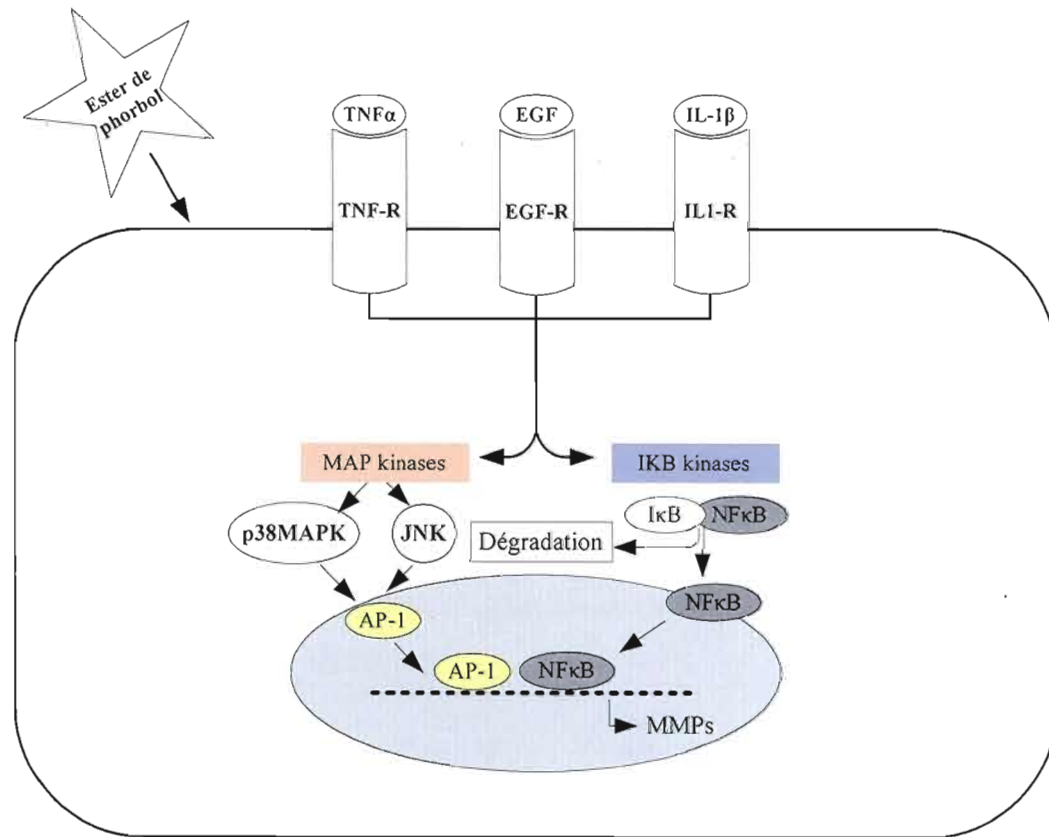


Figure 9: Les voies de signalisation impliquées dans le contrôle de l'expression des MMPs. Sous l'effet de l'EGF, l'IL1 β et/ou du TNF α , les deux grandes voies de signalisation, I- κ B kinase et MAPKinase, sont activées aboutissant ainsi aux recrutements nucléaires de différents facteurs transcriptionnels tels AP-1 ou NF- κ B qui vont réguler positivement la transcription des MMPs (Adaptée de Rannou et *al.*, 2005). (R&

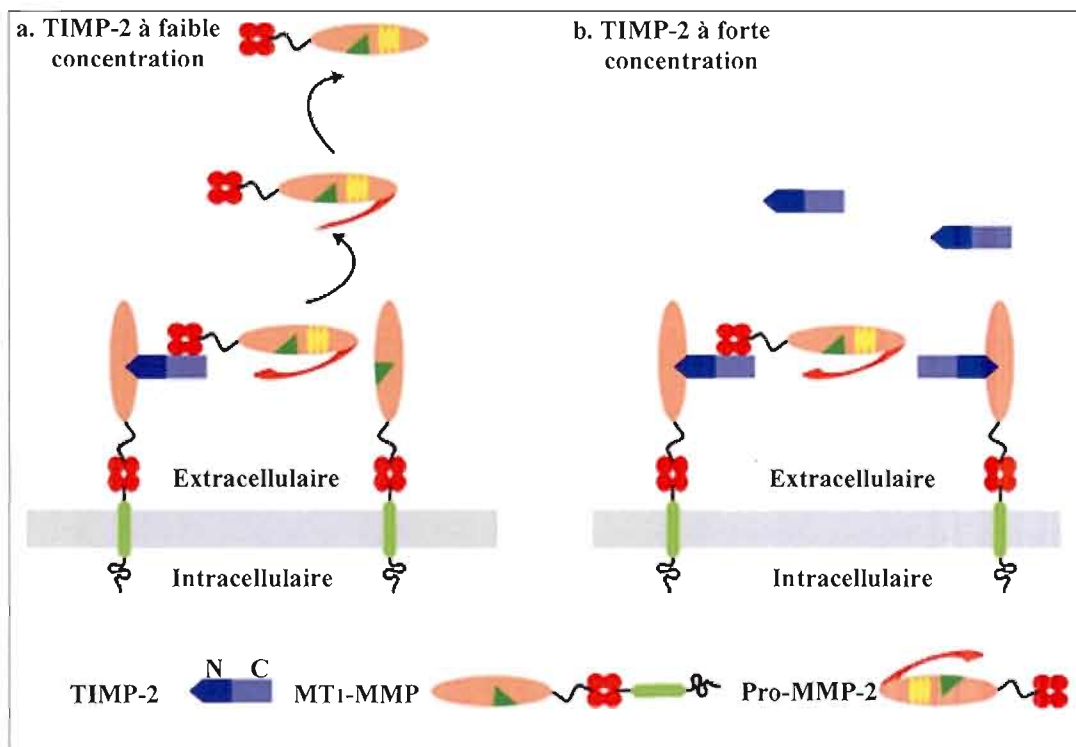


Figure 10: Mécanisme d'activation de la proMMP-2. (a) La métalloprotéinase matricielle membranaire de type-1 (MT1-MMP) se lie via son domaine catalytique au domaine N-terminal de l'inhibiteur tissulaire de métalloprotéinases-2 (TIMP-2) à la surface cellulaire. Ce complexe binaire agit alors comme un récepteur pour la proMMP-2, via le domaine C-terminal du TIMP-2. Une molécule de MT1-MMP active et libre à proximité peut alors cliver le propeptide du la proMMP-2, générant une forme intermédiaire. En outre, la protéolyse du propeptide qui résulte soit d'un auto-clivage, soit par action de la plasmine, ou d'autres MMPs actives amène à la production de l'enzyme en pleine activité. L'activation de la proMMP-2 dans ce modèle n'est possible que si la concentration de TIMP-2 est faible et suffisante pour générer le complexe trimoléculaire. (b) À des niveaux élevés de TIMP-2, cette dernière se lie et inhibe toutes les MT1-MMP requises pour la protéolyse du propeptide, empêchant ainsi l'activation de la proMMP-2 (Lafleur *et al.*, 2003).

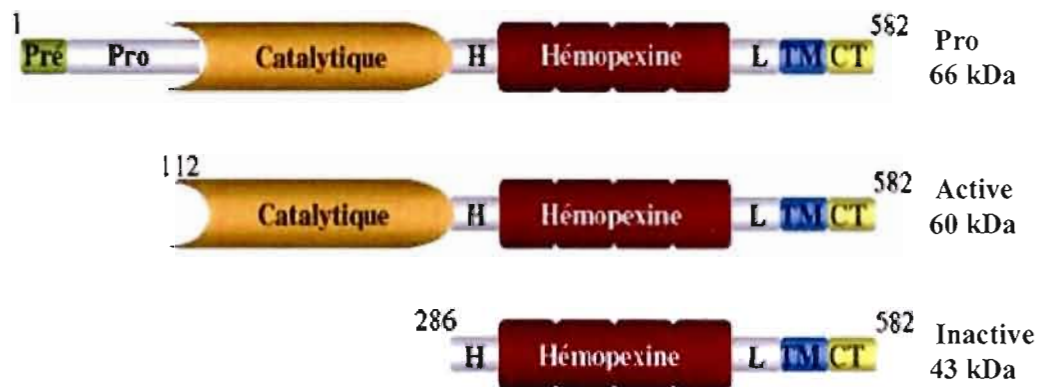


Figure 11: Domaines structuraux de la MT1-MMP. Pré/Pro: Pré/Propeptide; domaine catalytique; H: domaine charnière (hinge); domaine hémoexine; L: domaine «linker»; TM: domaine transmembranaire; CT: domaine cytoplasmique.

CHAPITRE II

PROJET DE RECHERCHE

2.1. Problématique

L'étude des MMPs est un domaine en pleine expansion du fait de leur implication à divers stades de la progression tumorale. Depuis sa découverte, la MT1-MMP a été la MMP la plus étudiée (Itoh et Seiki, 2004). Elle est désormais reconnue comme étant une enzyme essentielle impliquée dans le remodelage de la MEC, dans la migration de diverses cellules cancéreuses et endothéliales, ainsi que dans l'angiogenèse et la métastase (Beliën *et al.*, 1999 ; Koshikawa *et al.*, 2000 ; Rozanov *et al.*, 2001). La MT1-MMP, dont les fonctions protéolytiques sont bien documentées, a été identifiée à l'origine comme un récepteur et un activateur spécifique de la proMMP-2 à la surface cellulaire (Sato *et al.*, 1994). L'activation de la proMMP-2 par la MT1-MMP a été étroitement reliée au potentiel invasif de plusieurs types de cellules tumorales entre autre les cellules de glioblastomes humains. De plus, l'augmentation de l'expression de MT1-MMP est aussi corrélée histologiquement avec le grade malin des gliomes (Lampert *et al.*, 1998 ; Özen *et al.*, 2004). Compte tenu de ces données, un ciblage efficace des fonctions de MT1-MMP nous apparaît alors comme une stratégie judicieuse dans l'identification et le développement de nouvelles molécules capables de bloquer la progression tumorale.

De par sa structure, la MT1-MMP est capable d'interagir autant avec l'environnement extracellulaire qu'avec des partenaires moléculaires intracellulaires. Parmi ses différents domaines structuraux, le domaine cytoplasmique de MT1-MMP joue un rôle important dans l'endocytose de la protéine (Labrecque *et al.*, 2004), dans la transduction de signaux qui régulent la balance entre la survie et la mort cellulaire (Belkaid *et al.*, 2007 ; Fortier *et al.*, 2008), et la radiorésistance des cellules gliales (Wild-Bode *et al.*, 2001). Toutefois, le rôle du domaine cytoplasmique de MT1-MMP dans la transduction de signaux intracellulaires demeure encore très peu documenté. Notre groupe a montré récemment l'existence d'un axe de signalisation entre MT1-MMP et le modulateur pro-inflammatoire Cox-2 dans une population de cellules souches cancéreuses CD133(+) dérivée d'une lignée de glioblastome.

L'identification des effecteurs moléculaires en aval de MT1-MMP responsables de l'induction de l'expression de Cox-2 dans les glioblastomes humain U87, nous permettrait d'entrevoir le développement de nouvelles voies d'inhibition de la fonction intracellulaire de MT1-MMP à des fins thérapeutiques.

2.2. Hypothèses de travail

Hypothèse 1 : L'actinonine possède des effets anti-angiogéniques en ciblant l'aminopeptidase N (APN/CD13), une métalloprotéase transmembranaire surexprimée dans certaines tumeurs solides et hématologiques. Nous émettons l'hypothèse qu'un inhibiteur, tel que l'actinonine, pourrait avoir une fonction spécifique double qui entraverait les protéases membranaires telles APN/CD13 et MT1-MMP.

Hypothèse 2 : Du fait que la voie de signalisation de NF- κ B soit impliquée dans le processus inflammatoire reflété par l'expression de Cox-2 et qu'il existe un axe de signalisation entre la MT1-MMP et Cox-2 dans les CSC CD133(+), nous émettons l'hypothèse que MT1-MMP pourrait être un point d'initiation de signalisation intracellulaire contrôlant l'expression de multiples gènes impliqués dans la progression tumorale cérébrale tels que Cox-2 en mettant en jeu des effecteurs moléculaires clés de la voie de NF- κ B.

2.3. Objectifs de recherche

Le premier objectif de ma recherche était d'évaluer biologiquement l'action de l'actinonine et sa capacité à inhiber la fonction catalytique de MT1-MMP responsable de l'activation de la proMMP-2 dans les cellules de gliome U87. Le second objectif de ma recherche était de déterminer les acteurs clés impliqués dans l'axe de signalisation MT1-MMP/Cox-2 en utilisant des modèles cellulaires de fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) mutés pour différents membres des protéines kinases IKK (*MEF-IKK α ^{-/-}*, *IKK β ^{-/-}* et *IKK γ ^{-/-}*) et également les membres de la famille de NF- κ B dont les p50 et p65 (*MEF-p50^{-/-}* et *p65^{-/-}*).

CHAPITRE III

ARTICLES

3.1. Cell-based evidence for aminopeptidase N/CD13 inhibitor actinonin targeting of MT1-MMP-mediated proMMP-2 activation

Asmaa Sina, Simon Lord-Dufour and Borhane Annabi

*Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de Chimie, Centre de Recherche
BioMED, Université du Québec à Montréal, Quebec, Canada*

Article publié dans le journal scientifique *Cancer Letters*

Cell-based evidence for aminopeptidase N/CD13 inhibitor actinonin targeting of MT1-MMP-mediated proMMP-2 activation

Asmaa Sina, Simon Lord-Dufour and Borhane Annabi*

Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de Chimie, Centre de Recherche BioMED, Université du Québec à Montréal, Québec, Canada

* To whom correspondence and reprint requests should be directed

Laboratoire d'Oncologie Moléculaire

Université du Québec à Montréal

C.P. 8888, Succ. Centre-ville

Montréal, Québec

CANADA

H3C 3P8

Phone: (514) 987-3000 ext. 7610

Fax: (514) 987-0246

E-mail: annabi.borhane@uqam.ca

Running title: Actinonin inhibits MT1-MMP

The abbreviations used are: Aminopeptidase N, APN; concanavalin-A, ConA; extracellular matrix, ECM; human umbilical vein endothelial cells, HUVEC; matrix metalloproteinase, MMP; MT1-MMP, membrane type-1 MMP; RECK, reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs.

Abstract

Recent profiling has identified the aminopeptidase N/CD13 inhibitor actinonin as a selective soluble secreted matrix metalloproteinase (MMP) inhibitor. Given that actinonin's effects against membrane-bound MMPs remain unknown and that MT1-MMP has been linked to chemo- and radio-therapy resistance in brain tumor development, we therefore assessed MT1-MMP functional inhibition by actinonin in U87 glioblastoma cells. We show that actinonin inhibits concanavalin-A (ConA)-induced proMMP-2 activation, while it does not inhibit ConA-induced MT1-MMP gene expression suggesting post-transcriptional effects of the drug possibly mediated through the membrane-anchored protease regulator RECK. Specific gene silencing of MT1-MMP with siRNA abrogated the ability of ConA to activate proMMP-2. Functional recombinant MT1-MMP whose constitutive expression led to proMMP-2 activation was also efficiently antagonized by actinonin. We provide evidence for actinonin's new therapeutic application in the direct targeting of MT1-MMP-mediated proMMP-2 activation, an essential step in both brain tumor infiltration and in brain tumor-associated angiogenesis.

Key words: MT1-MMP, aminopeptidase N/CD13 inhibitor, glioblastoma, concanavalin, RECK

Introduction

Actinonin has been ascribed several inhibitory activities, amongst which inhibition of transmembrane protease aminopeptidase N (APN)/CD13 [1] and peptide deformylase [2, 3], as well as antiproliferative effects against human tumor cells [4] were reported. Tumor-infiltrating T cells in renal and lung cancers [5, 6] as well as in tumoral, but not normal, vasculature [7], are all characterized by high APN/CD13 levels, and also represent potential targets for actinonin. While enhanced expression of membrane and/or soluble forms of APN/CD13 is observed in many cancers [8-11], it must be pointed out that actinonin, intriguingly, also inhibited the growth of both CD13-positive myeloid and CD13-negative lymphoma cell lines, suggesting that the effects induced by actinonin are unlikely to be solely mediated by CD13 inhibition [12]. Furthermore, gene silencing of APN/CD13 in endothelial cells resulted in the inhibition of *in vitro* tubulogenesis, suggesting that APN/CD13 inhibition may affect important processes such as in vascular endothelial morphogenesis and during angiogenesis [13].

Apart from all these observations, it has emerged that potential alternate transmembrane proteases which, similar to APN/CD13, may impact those same critical processes involved in angiogenesis and in tumor development and thus be targeted by actinonin. Among these, membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP), an important protein related to tumor growth and angiogenesis, is expressed on malignant tumor cells and in activated endothelial cells [14]. Furthermore, MT1-MMP is part of the specific transmembrane proteases family that regulates cell growth and invasion and that may also contribute to angiogenesis [15]. MT1-MMP is involved in cell migration, extracellular matrix (ECM) degradation and endothelial cell tubulogenesis [16]. Detailed studies by RNA interference recently revealed that MT1-MMP also controls mesenchymal stromal cell mobilization and homing processes, which require invasion through ECM barriers [17, 18] and which may possibly contribute to brain tumor development [19]. In addition, previous demonstration that MT1-MMP can function as an activator of latent proMMP-2 [20] was later strengthened by demonstrations that reduced activation of proMMP-2 was observed in various tissues of

MT1-MMP null mice [21] and that inhibition of MT1-MMP by cancer drugs interfered with the homing of diabetogenic T cells into the pancreas [22].

Because of MT1-MMP's ability to promote directed cell migration across reconstituted basement membranes both in metastasis and in tumor angiogenesis processes, newly developed oncogenic strategies, including specific immunoliposomal anticancer MT1-MMP targeting [23] and RNA interference technology [24] are currently under consideration. The design, use, and evaluation of these approaches have, however, been more complex than expected. More recently, we identified glycocluster constructions that may serve in carbohydrate-based anticancer strategies through their ability to specifically target MT1-MMP pleiotropic functions in cell survival, proliferation and ECM degradation [25]. In the present study, we extend our efforts to identify new molecules with anti-MT1-MMP inhibitory functions and to provide the first cell-based evidence that the APN/CD13 inhibitor actinonin directly abrogates MT1-MMP's ability to activate latent proMMP-2 in highly invasive U87 glioma cells.

Materials and Methods

Reagents

Sodium dodecylsulfate (SDS) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma (Oakville, ON). Cell culture media were obtained from Life Technologies (Burlington, ON). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON). The enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were from Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, QC). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Pierce (Rockford, IL). The polyclonal antibody against MT1-MMP was from Chemicon (Temecula, CA).

Cell culture, transfection method, and survival assay

The U87 glioblastoma cell line was purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA) and cultured in Eagle's Minimum essential medium (MEM) containing 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) (HyClone Laboratories, Logan, UT) and 2 mM glutamine, at 37°C under a humidified atmosphere containing 5% CO₂. U87 glioblastoma cells were either

transiently transfected with an expression vector for full length MT1-MMP fused to GFP [26], or with 20 nM siRNA (see below) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Burlington, ON). The occurrence of MT1-MMP specific gene knockdown was evaluated by assessing ConA's ability to trigger MT1-MMP-mediated proMMP-2 activation. Mock transfections of U87 cultures with GFP expression vectors alone were used as controls. Cell death was quantified by lactate dehydrogenase (LDH) release assay according to the manufacturer's protocol (Fisher Scientific, Nepean, ON).

RNA interference

RNA interference experiments were performed using Lipofectamine 2000. A small interfering RNA against MT1-MMP (siMT1-MMP) and mismatch siRNA were synthesized by EZBiolab Inc. (Westfield, IN) and annealed to form duplexes. The sequence of the siMT1-MMP used in this study is as follows : 5'-CCAGAAGCUGAAGGUAGAAAdTdT-3' (sense) and 5'-UUCUACCUUCAGCUUCUGGdTdT-3' (antisense) [27]. The diminution of MT1-MMP expression, as assessed by RT-PCR, was routinely over ~85% (not shown). U87 cells were also transiently transfected with 20 nM siRNA against RECK (Hs_RECK_5 HP siRNA, SI04146072; Hs_RECK_6 HP siRNA, SI04174282; Hs_RECK_7 HP siRNA, SI04195464; Hs_RECK_8 HP siRNA, SI04350318, QIAGEN, CA). RECK-specific gene knockdown was evaluated by qRT-PCR as described below.

Gelatin zymography

Gelatin zymography was used to assess the extent of latent proMMP-2 and active MMP-2 activity. Briefly, an aliquot (20 μ l) of the culture medium was subjected to SDS-PAGE in a gel containing 0.1 mg/ml gelatin. The gels were then incubated in 2.5% Triton X-100 and rinsed in nanopure distilled H₂O. Gels were further incubated at 37°C for 20 hrs in 20 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.02% Brij-35, 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6, then stained with 0.1% Coomassie Brilliant blue R-250 and destained in 10% acetic acid, 30% methanol in H₂O. Gelatinolytic activity was detected as unstained bands on a blue background.

cDNA synthesis and real-time quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from cultured U87 cells using TRIzol reagent (Invitrogen). For cDNA synthesis, ~1 µg total RNA was reverse-transcribed into cDNA using a high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). cDNA was stored at -80°C for PCR. Gene expression was quantified by real-time quantitative PCR using iQ SYBR Green Supermix (BIO-RAD, Hercules, CA). DNA amplification was carried out using an Icyler iQ5 machine (BIO-RAD, Hercules, CA) and product detection was performed by measuring the binding of the fluorescent dye SYBR Green I to double-stranded DNA. MT1-MMP and RECK primer sets were derived from human sequences and provided by QIAGEN (Valencia, CA). The relative quantities of target gene mRNA against an internal control, 18S ribosomal RNA, were measured by following a ΔC_T method. An amplification plot of fluorescence signal vs. cycle number was drawn. The difference (ΔC_T) between the mean values in the triplicate samples of target gene and those of 18S ribosomal RNA were calculated by iQ5 Optical System Software version 2.0 (BIO-RAD, Hercules, CA) and the relative quantified value (RQV) was expressed as $2^{-\Delta C_T}$.

Immunoblotting procedures

Lysates or plasma membrane preparations [28] from control and treated cells were separated by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). After electrophoresis, proteins were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes which were then blocked for 1 hr at room temperature with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline (150 mM NaCl, 20 mM Tris–HCl, pH 7.5) containing 0.3% Tween-20 (TBST). Membranes were further washed in TBST and incubated with the MT1-MMP primary antibody (1/1,000 dilution) in TBST containing 3% bovine serum albumin and 0.02% NaN₃, followed by a 1 hr incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (1/2,500 dilution) in TBST containing 5% non-fat dry milk. Immunoreactive material was visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences, Baie d’Urfée, QC).

Results

Actinonin inhibits concanavalin-A-induced proMMP-2 activation and MT1-MMP proteolytic processing

Concanavalin-A (ConA) is thought to trigger latent proMMP-2 activation into its active MMP-2 form [25, 29]. Therefore, U87 glioma cells were serum-starved and treated with increasing concentrations of ConA, and then conditioned media were harvested in order to assess the extent of proMMP-2 activation by gelatin zymography. We observed that ConA dose-dependently induced proMMP-2 activation and that this was correlated with both induction of the mature MT1-MMP form expression and with MT1-MMP proteolytic processing, as shown by the appearance of its proteolytic 43 kDa fragment (Fig.1A). When actinonin was added in conjunction with ConA, we observed a dose-dependent decrease in proMMP-2 activation by ConA, which was also correlated with a decrease in MT1-MMP proteolytic processing (Fig.1B). Actinonin's inhibitory effect on MMP-2 was found complete at 50 μ M (Fig.1C), while it did not affect cell survival or proMMP-2 expression (Fig.1C). In order to compare actinonin's efficacy at inhibiting ConA-induced proMMP-2 activation, we also showed that ilomastat, a broad-spectrum MMP inhibitor [30], abrogated proMMP-2 activation similarly to actinonin (Fig.1D). These observations suggest that actinonin antagonizes proMMP-2 activation processes possibly involving MT1-MMP functions.

Actinonin does not inhibit concanavalin-A-induced MT1-MMP gene expression

In order to further delineate the molecular impact of actinonin on MT1-MMP-mediated processes, we next explored whether gene expression was affected. U87 glioma cells were treated (or not) with ConA, total RNA was isolated as described in the Methods section, and MT1-MMP gene expression was assessed using qRT-PCR. ConA induced MT1-MMP gene expression (Fig.2, black bars) in agreement with the increase in protein levels we observed in Fig.1A and with previous work [17, 29, 31]. Interestingly, while ilomastat and actinonin were efficient in inhibiting ConA-induced proMMP-2 activation (Fig.1), neither was able to downregulate MT1-MMP gene expression. This suggests that actinonin affects MT1-MMP functions at the cell surface rather than at the level of gene expression.

Actinonin inhibits recombinant MT1-MMP-induced proMMP-2 activation

While most previous assays of actinonin's effects on MMPs were performed against secreted soluble MMP (MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -10, -12, and -13), actinonin's direct impact on MT1-MMP functions remained to be demonstrated [32]. In order to assess the contribution of MT1-MMP to the ConA-mediated activation of proMMP-2, we first had to confirm that MT1-MMP was involved in ConA-mediated proMMP-2 activation. We used siRNA gene silencing strategies to specifically downregulate MT1-MMP gene expression in U87 glioma cells. Mock and siMT1-MMP cells were then treated (or not) with ConA and MT1-MMP silencing effectively antagonized ConA's ability to trigger proMMP-2 activation (Fig.3A). We next transiently transfected U87 cells with an expression vector for MT1-MMP as previously validated by us [17, 29]. Constitutive expression of recombinant MT1-MMP protein in transfected cells was confirmed by western blotting and was not inhibited by either actinonin or ilomastat (Fig.3B, upper panel). The recombinant MT1-MMP protein was further shown to be fully active as its cell surface expression led to increased proMMP-2 activation as assessed by zymography from the isolated conditioned media (Fig.3B, lower panel). Finally, the recombinant MT1-MMP-mediated proMMP-2 activation was completely abrogated by both ilomastat and actinonin (Fig.3B). Altogether, this is the first cell-based demonstration of a novel and direct effect of actinonin on MT1-MMP function.

Gene silencing of RECK prevents concanavalin-A-induced MT1-MMP proteolytic activation

Recently, the reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) was demonstrated to interact with MT1-MMP and CD13/aminopeptidase N, and to modulate their endocytic pathways [33]. This modulation correlated with the accelerated internalization and decay of MT1-MMP and CD13. Based on the relevance of those data to the current study, we used gene silencing (siRNA) strategies to address whether such mechanism is in fact involved upon U87 treatment with actinonin. The rationale being that if RECK was involved in any MT1-MMP-internalisation process upon actinonin treatment, then this would result in the differential depletion of MT1-MMP from plasma membrane preparations. We therefore tested 4 different siRNA sequences to knockdown RECK gene expression and used qRT-

PCR to demonstrate that efficient knockdown of RECK by more than ~72% in U87 cells was achieved with siRNA construct #4 (Fig.4a). Furthermore, we now also demonstrate that actinonin's effects (i.e. inhibition of MT1-MMP-mediated proMMP-2 activation) are in fact possibly dependent of RECK's-mediated MT1-MMP internalisation processes. Gene silencing of RECK with construct #4 partially prevented concanavalin-A-induced MT1-MMP proteolytic activation (Fig.4b, upper panel). Actinonin was further unable to antagonize MT1-MMP proteolytic activation in siRECK-transfected cells, in contrast to Mock-transfected cells (Fig.4b). Intriguingly, actinonin was able to reverse proMMP-2 activation in both Mock- and siRECK-transfected cells as shown by gelatin-zymography (Fig.4b, lower panel). This is suggesting that a pool of cell surface MT1-MMP remains insensitive to RECK's interaction. Altogether, these results confirm a potential molecular link between MT1-MMP and CD13/aminopeptidase N [33], which could partly explain actinonin's inhibitory effects on MT1-MMP-mediated proMMP-2 activation.

Discussion

One of the most exciting findings over recent years was the discovery of a cell-associated membrane-bound MMP, MT1-MMP/MMP-14, and the subsequent demonstration that this molecule can function as an activator of latent proMMP-2 [20]. While disruption of MMP-2 in mice had only a minor effect on development and growth [34], disruption of MT1-MMP caused craniofacial dysmorphism, arthritis, osteopenia, dwarfism, and fibrosis of soft tissues due, in part, to ablation of collagenolytic activity [35]. Moreover, MT1-MMP gene silencing also abrogated angiogenesis-related disease [24] as well as cell invasive properties [27]. These findings implicate pivotal functions for MT1-MMP not only in physiological connective tissue metabolism, but also in pathological tumor-associated invasive processes [16, 36].

Gliomas remain a great challenge in oncology today as they account for more than 50% of all brain tumors and are by far the most common primary brain tumors in adults [37]. Many of the mechanisms involved in brain tumor resistance to chemotherapy or to radiation-induced cell death have been recognized [38], and high expression of MT1-MMP was clearly identified as a potential molecular contributor to therapy resistance in glioblastomas [39, 40]. As ECM proteolysis is a necessary part of the invasive and infiltrative phenotype of brain tumors, and MT1-MMP plays a central role in proteolysis [41, 42], the screening of new molecules such as actinonin combined with the development of current pharmaceutical approaches that directly affect the expression and/or function interplay between MT1-MMP, APN/CD13 as well as of RECK involvement in the cell surface recycling of these two molecules, may prove beneficial in targeting invading glioma cells.

Our data, most importantly, suggests reconsidering the molecular targets and mechanisms underlying the anti-angiogenic effects of actinonin, which were initially thought to involve APN/CD13 metalloprotease. APN/CD13 has been shown to be expressed on the human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) of angiogenic, but not normal, vasculature [43]. Functional antagonists of APN (bestatin, amastatin, CD13 antibody) abrogated the ability of HUVEC, cultured on Matrigel, to organize a capillary network [10, 44]. Still, the direct

involvement of APN/CD13 in the anti-angiogenic molecular mechanism of action of actinonin remained, however, unclear. One main argument being that pathological angiogenesis is often accompanied by the formation of a fibrinous matrix, which consists of fibrin, collagen fibers and plasma proteins, all features characteristic of alternate cell surface proteases such as MT1-MMP [45, 46]. Accordingly, endothelial cell assembly into capillary-like structures within collagen/fibrin gels is also thought to require the activity of MT1-MMP [47-49]. Inhibitors such as actinonin may therefore find a dual function in inhibiting specific membrane bound proteases such as APN/CD13 and MT1-MMP, with a combined impact in both ECM degradation and in tubulogenesis processes.

In conclusion, we report the first direct, cell-based biological evaluation of actinonin against MT1-MMP. The specific action of actinonin revolves around its capacity to directly antagonize MT1-MMP-mediated activation of latent proMMP-2 in U87 glioma cells. While novel approaches to the inhibition of MT1-MMP activity are currently being explored [23-25], our observations may in fact find broader molecular and therapeutic implications which are not limited to MT1-MMP's ability to activate proMMP-2 or to contribute to therapy resistance. Based on our results, it is tempting to suggest that inhibition of MT1-MMP functions may also abrogate cell migration through MT1-MMP-mediated epidermal growth factor (EGF) receptor transactivation [50] or signaling through the EGF receptor [51]. Other avenues to explore involve actinonin's direct effect on MT1-MMP functions that may also impact on the new and appealing MT1-MMP's ability to promote CD133-positive cancer stem cells invasive properties and that could possibly be targeted by actinonin [52].

Acknowledgements

BA holds a Canada Research Chair in Molecular Oncology from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). AS is a recipient of a Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) Scholarship. This study was funded by a grant of the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to BA.

References

- [1] Bauvois, B.; Dauzonne, D. Aminopeptidase-N/CD13 (EC 3.4.11.2) inhibitors: chemistry, biological evaluations, and therapeutic prospects. *Med Res Rev.* 2006, *26*, 88-130.
- [2] Giglione, C.; Pierre, M.; Meinnel, T. Peptide deformylase as a target for new generation, broad spectrum antimicrobial agents. *Mol Microbiol.* 2000, *36*, 1197-1205.
- [3] Van Aller, G.S.; Nandigama, R.; Petit, C.M.; DeWolf, W.E. Jr.; Quinn, C.J.; Aubart, K.M.; Zalacain, M.; Christensen, S.B.; Copeland, R.A.; Lai, Z. Mechanism of time-dependent inhibition of polypeptide deformylase by actinonin. *Biochemistry.* 2005, *44*, 253-260.
- [4] Lee, M.D.; She, Y.; Soskis, M.J.; Borella, C.P.; Gardner, J.R.; Hayes, P.A.; Dy, B.M.; Heaney, M.L.; Philips, M.R.; Bornmann, W.G.; Sirotnak, F.M.; Scheinberg, D.A. Human mitochondrial peptide deformylase, a new anticancer target of actinonin-based antibiotics. *J Clin Invest.* 2004, *114*, 1107-1116.
- [5] Riemann, D.; Kehlen, A.; Thiele, K.; Löhn, M.; Langner, J. Induction of aminopeptidase N/CD13 on human lymphocytes after adhesion to fibroblast-like synoviocytes, endothelial cells, epithelial cells, and monocytes/macrophages. *J Immunol.* 1997, *158*, 3425-3432.
- [6] Kehlen, A.; Olsen, J.; Langner, J.; Riemann, D. Increased lymphocytic aminopeptidase N/CD13 promoter activity after cell-cell contact. *J Cell Biochem.* 2000, *80*, 115-123.
- [7] Rangel, R.; Sun, Y.; Guzman-Rojas, L.; Ozawa, M.G.; Sun, J.; Giordano, R.J.; Van Pelt, C.S.; Tinkey, P.T.; Behringer, R.R.; Sidman, R.L.; Arap, W.; Pasqualini, R. Impaired angiogenesis in aminopeptidase N-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007, *104*, 4588-4593.
- [8] Fujii, H.; Nakajima, M.; Saiki, I.; Yoneda, J.; Azuma, I.; Tsuruo, T. Human melanoma invasion and metastasis enhancement by high expression of aminopeptidase N/CD13. *Clin Exp Metastasis.* 1995, *13*, 337-344.
- [9] Ikeda, N.; Nakajima, Y.; Tokuhara, T.; Hattori, N.; Sho, M.; Kanehiro, H.; Miyake, M. Clinical significance of aminopeptidase N/CD13 expression in human pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2003, *9*, 1503-1508.
- [10] Hashida, H.; Takabayashi, A.; Kanai, M.; Adachi, M.; Kondo, K.; Kohno, N.; Yamaoka, Y.; Miyake, M. Aminopeptidase N is involved in cell motility and angiogenesis: its clinical significance in human colon cancer. *Gastroenterology.* 2002, *122*, 376-386.

- [11] Kehlen, A.; Lendeckel, U.; Dralle, H.; Langner, J.; Hoang-Vu, C. Biological significance of aminopeptidase N/CD13 in thyroid carcinomas. *Cancer Res.* 2003, *63*, 8500-8506.
- [12] Xu, Y.; Lai, L.T.; Gabrilove, J.L.; Scheinberg, D.A. Antitumor activity of actinonin in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res.* 1998, *4*, 171-176.
- [13] Fukasawa, K.; Fujii, H.; Saitoh, Y.; Koizumi, K.; Aozuka, Y.; Sekine, K.; Yamada, M.; Saiki, I.; Nishikawa, K. Aminopeptidase N (APN/CD13) is selectively expressed in vascular endothelial cells and plays multiple roles in angiogenesis. *Cancer Lett.* 2006, *243*, 135-143.
- [14] Sato, H.; Takino, T.; Miyamori, H. Roles of membrane-type matrix metalloproteinase-1 in tumor invasion and metastasis. *Cancer Sci.* 2005, *96*, 212-217.
- [15] Bauvois, B. Transmembrane proteases in cell growth and invasion: new contributors to angiogenesis? *Oncogene.* 2004, *23*, 317-329.
- [16] Genís, L.; Gálvez, B.G.; Gonzalo, P.; Arroyo, A.G. MT1-MMP: universal or particular player in angiogenesis? *Cancer Metastasis Rev.* 2006, *25*, 77-86.
- [17] Currie, J.C.; Fortier, S.; Sina, A.; Galipeau, J.; Cao, J.; Annabi, B. MT1-MMP down-regulates the glucose 6-phosphate transporter expression in marrow stromal cells: a molecular link between pro-MMP-2 activation, chemotaxis, and cell survival. *J Biol Chem.* 2007, *282*, 8142-8149.
- [18] Ries, C.; Egea, V.; Karow, M.; Kolb, H.; Jochum, M.; Neth, P. MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood.* 2007, *109*, 4055-4063.
- [19] Nakamizo, A.; Marini, F.; Amano, T.; Khan, A.; Studeny, M.; Gumin, J.; Chen, J.; Hentschel, S.; Vecil, G.; Dembinski, J.; Andreeff, M.; Lang, F.F. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res.* 2005, *65*, 3307-3318. Erratum in: *Cancer Res.* 2006; *66*:5975.
- [20] Strongin, A.Y.; Collier, I.; Bannikov, G.; Marmer, B.L.; Grant, G.A.; Goldberg, G.I. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem.* 1995, *270*, 5331-5338.
- [21] Zhou, Z.; Apte, S.S.; Soininen, R.; Cao, R.; Baaklini, G.Y.; Rauser, R.W.; Wang, J.; Cao, Y.; Tryggvason, K. Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase I. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000, *97*, 4052-4057.
- [22] Savinov, A.Y.; Rozanov, D.V.; Golubkov, V.S.; Wong, F.S.; Strongin, A.Y. Inhibition of membrane type-1 matrix metalloproteinase by cancer drugs interferes with the

- homing of diabetogenic T cells into the pancreas. *J Biol Chem.* 2005, 280, 27755-27758.
- [23] Atobe, K.; Ishida, T.; Ishida, E.; Hashimoto, K.; Kobayashi, H.; Yasuda, J.; Aoki, T.; Obata, K.; Kikuchi, H.; Akita, H.; Asai, T.; Harashima, H.; Oku, N.; Kiwada, H. In vitro efficacy of a sterically stabilized immunoliposomes targeted to membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *Biol Pharm Bull.* 2007, 30, 972-978.
 - [24] Arroyo, A.G.; Genís, L.; Gonzalo, P.; Matías-Román, S.; Pollán, A.; Gálvez, B.G. Matrix metalloproteinases: new routes to the use of MT1-MMP as a therapeutic target in angiogenesis-related disease. *Curr Pharm Des.* 2007, 13, 1787-1802.
 - [25] Fortier, S.; Touaibia, M.; Lord-Dufour, S.; Galipeau, J.; Roy, R.; Annabi, B. Tetra- and hexavalent mannosides inhibit the pro-apoptotic, antiproliferative and cell surface clustering effects of concanavalin-A: impact on MT1-MMP functions in marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Glycobiology.* 2008, 18, 195-204.
 - [26] Cao, J.; Chiarelli, C.; Kozarekar, P.; Adler, H.L. Membrane type 1-matrix metalloproteinase promotes human prostate cancer invasion and metastasis. *Thromb Haemost.* 2005, 93, 770-778.
 - [27] Neth, P.; Ciccarella, M.; Egea, V.; Hoelters, J.; Jochum, M.; Ries, C. Wnt signaling regulates the invasion capacity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2006, 24, 1892-1903.
 - [28] Annabi, B.; Lachambre, M.; Bousquet-Gagnon, N.; Pagé, M.; Gingras, D.; Béliveau, R. Localization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in caveolae membrane domains. *Biochem J.* 2001, 353, 547-553.
 - [29] Belkaid, A.; Fortier, S.; Cao, J.; Annabi, B. Necrosis induction in glioblastoma cells reveals a new "bioswitch" function for the MT1-MMP/G6PT signaling axis in proMMP-2 activation versus cell death decision. *Neoplasia.* 2007, 9, 332-340.
 - [30] Saghatelian, A.; Jessani, N.; Joseph, A.; Humphrey, M.; Cravatt, B.F. Activity-based probes for the proteomic profiling of metalloproteases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004, 101, 10000-10005.
 - [31] Annabi, B.; Thibeault, S.; Lee, Y.T.; Bousquet-Gagnon, N.; Eliopoulos, N.; Barrette, S.; Galipeau, J.; Béliveau, R. Matrix metalloproteinase regulation of sphingosine-1-phosphate-induced angiogenic properties of bone marrow stromal cells. *Exp Hematol.* 2003, 31, 640-649.
 - [32] Antczak, C.; Radu, C.; Djaballah, H. A profiling platform for the identification of selective metalloprotease inhibitors. *J Biomol Screen.* 2008, 13, 285-294.

- [33] Miki, T., Takegami, Y., Okawa, K., Muraguchi, T., Noda, M., Takahashi, C. The reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) interacts with membrane type 1 matrix metalloproteinase and CD13/aminopeptidase N and modulates their endocytic pathways. *J Biol Chem.* 2007, 282, 12341-12352.
- [34] Itoh, T.; Tanioka, M.; Yoshida, H.; Yoshioka, T.; Nishimoto, H.; Itohara, S. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res* 1998, 58, 1048-1051.
- [35] Holmbeck, K.; Bianco, P.; Caterina, J.; Yamada, S.; Kromer, M.; Kuznetsov, S.A.; Mankani, M.; Robey, P.G.; Poole, A.R.; Pidoux, I.; Ward, J.M.; Birkedal-Hansen, H. MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell.* 1999, 99, 81-92.
- [36] Itoh, Y.; Seiki, M. MT1-MMP: a potent modifier of pericellular microenvironment. *J Cell Physiol.* 2006, 206, 1-8.
- [37] Glioma Meta-analysis Trialists (GMT) Group. *Lancet.* 2002, 359, 1011-1018.
- [38] Berens, M.E.; Giese, A. (1999). "...those left behind." Biology and oncology of invasive glioma cells. *Neoplasia.* 1999, 1, 208-219.
- [39] Annabi, B.; Bouzeghrane, M.; Moumdjian, R.; Moghrabi, A.; Béliveau, R. Probing the infiltrating character of brain tumors: inhibition of RhoA/ROK-mediated CD44 cell surface shedding from glioma cells by the green tea catechin EGCg. *J Neurochem.* 2005, 94, 906-916.
- [40] McLaughlin, N.; Annabi, B.; Bouzeghrane, M.; Temme, A.; Bahary, J.P.; Moumdjian, R.; Béliveau, R. The Survivin-mediated radioresistant phenotype of glioblastomas is regulated by RhoA and inhibited by the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Brain Res.* 2006, 1071, 1-9.
- [41] Fillmore, H.L.; VanMeter, T.E.; Broaddus, W.C. Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs): expression and function during glioma invasion. *J Neurooncol.* 2001, 53, 187-202.
- [42] Nakada, M.; Kita, D.; Futami, K.; Yamashita, J.; Fujimoto, N.; Sato, H.; Okada, Y. Roles of membrane type 1 matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinases 2 in invasion and dissemination of human malignant glioma. *J Neurosurg.* 2001, 94, 464-473.
- [43] Pasqualini, R.; Koivunen, E.; Kain, R.; Lahdenranta, J.; Sakamoto, M.; Stryhn, A.; Ashmun, R.A.; Shapiro, L.H.; Arap, W.; Ruoslahti, E. Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res.* 2000, 60, 722-727.

- [44] Bhagwat, S.V.; Petrovic, N.; Okamoto, Y.; Shapiro, L.H. The angiogenic regulator CD13/APN is a transcriptional target of Ras signaling pathways in endothelial morphogenesis. *Blood*. 2003, *101*, 1818-1826.
- [45] Hiraoka, N.; Allen, E.; Apel, I.J.; Gyetko, M.R.; Weiss, S.J. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell*. 1998, *95*, 365-377.
- [46] Collen, A.; Hanemaaijer, R.; Lupu, F.; Quax, P.H.; van Lent, N.; Grimbergen, J.; Peters, E.; Koolwijk, P.; van Hinsbergh, V.W. Membrane-type matrix metalloproteinase-mediated angiogenesis in a fibrin-collagen matrix. *Blood*. 2003, *101*, 1810-1817.
- [47] d'Ortho, M.P.; Stanton, H.; Butler, M.; Atkinson, S.J.; Murphy, G.; Hembry, R.M. MT1-MMP on the cell surface causes focal degradation of gelatin films. *FEBS Lett*. 1998, *421*, 159-164.
- [48] Lafleur, M.A.; Handsley, M.M.; Knäuper, V.; Murphy, G.; Edwards, D.R. Endothelial tubulogenesis within fibrin gels specifically requires the activity of membrane-type-matrix metalloproteinases (MT-MMPs). *J Cell Sci*. 2002, *115*, 3427-3438.
- [49] Koike, T.; Vernon, R.B.; Hamner, M.A.; Sadoun, E.; Reed, M.J. MT1-MMP, but not secreted MMPs, influences the migration of human microvascular endothelial cells in 3-dimensional collagen gels. *J Cell Biochem*. 2002, *86*, 748-758.
- [50] Langlois, S.; Nyalendo, C.; Di Tomasso, G.; Labrecque, L.; Roghi, C.; Murphy, G.; Gingras, D.; Béliveau, R. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase stimulates cell migration through epidermal growth factor receptor transactivation. *Mol Cancer Res*. 2007, *5*, 569-583.
- [51] Kheradmand, F.; Rishi, K.; Werb, Z. Signaling through the EGF receptor controls lung morphogenesis in part by regulating MT1-MMP-mediated activation of gelatinase A/MMP2. *J Cell Sci*. 2002, *115*, 839-848.
- [52] Annabi, B.; Rojas-Sutterlin, S.; Laflamme, C.; Lachambre, M.P.; Rolland, Y.; Sartelet, H.; Béliveau, R. Tumor environment dictates medulloblastoma cancer stem cell expression and invasive phenotype. *Mol Cancer Res*. 2008, *6*, 907-916.

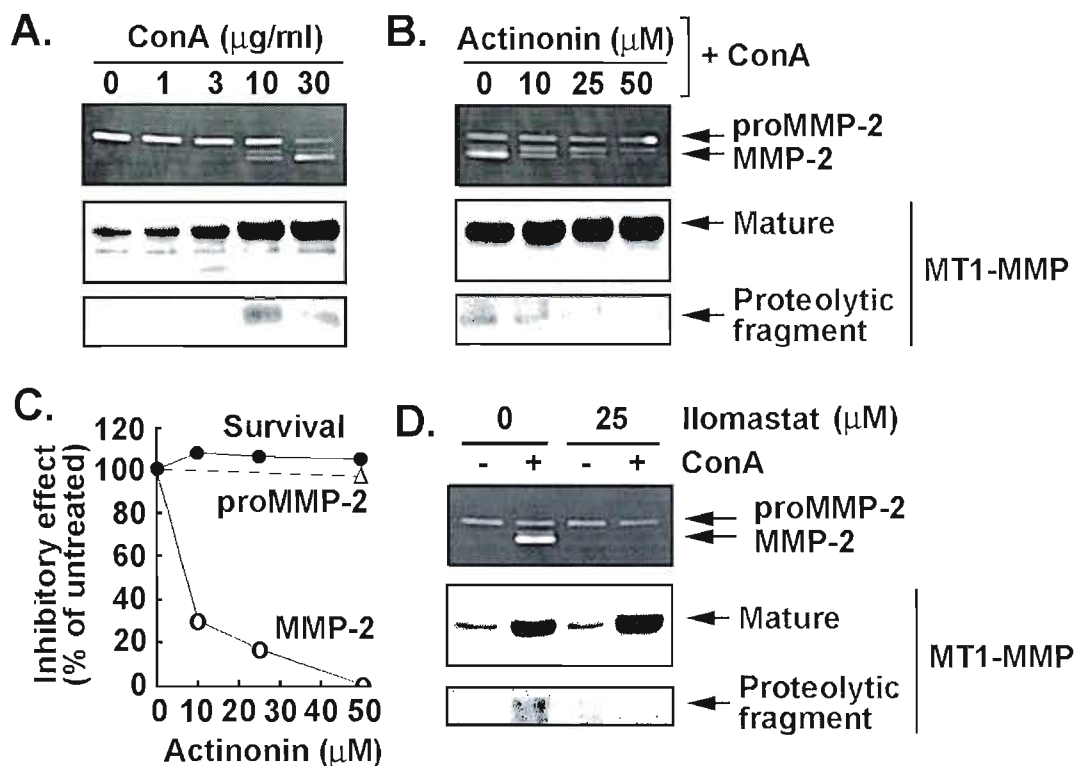


Figure 1: Actinonin inhibits concanavalin-A-induced proMMP-2 activation and MT1-MMP proteolytic processing. Serum-starved U87 glioma cells were cultured as described in the Methods section in the presence of (A) increasing concentrations of Concanavalin-A (ConA), (B) increasing concentrations of actinonin in the presence of 30 $\mu\text{g/ml}$ ConA, or (D) 25 μM Ilomastat in the presence of 30 $\mu\text{g/ml}$ ConA. Conditioned media were harvested in order to assess the extent of proMMP-2 activation by gelatin zymography (upper panels in A, B, and D). MT1-MMP expression (middle panels in A, B, and D) and MT1-MMP proteolytic processing (lower panels in A, B, and D) were assessed by western blotting and immunodetection performed as described in the Methods section. (C) ProMMP-2 (open triangle) and MMP-2 (open circles) levels were quantified by densitometry of the zymograms from (B). Lactate dehydrogenase (closed circles) release into the conditioned media was assessed to monitor cell survival.

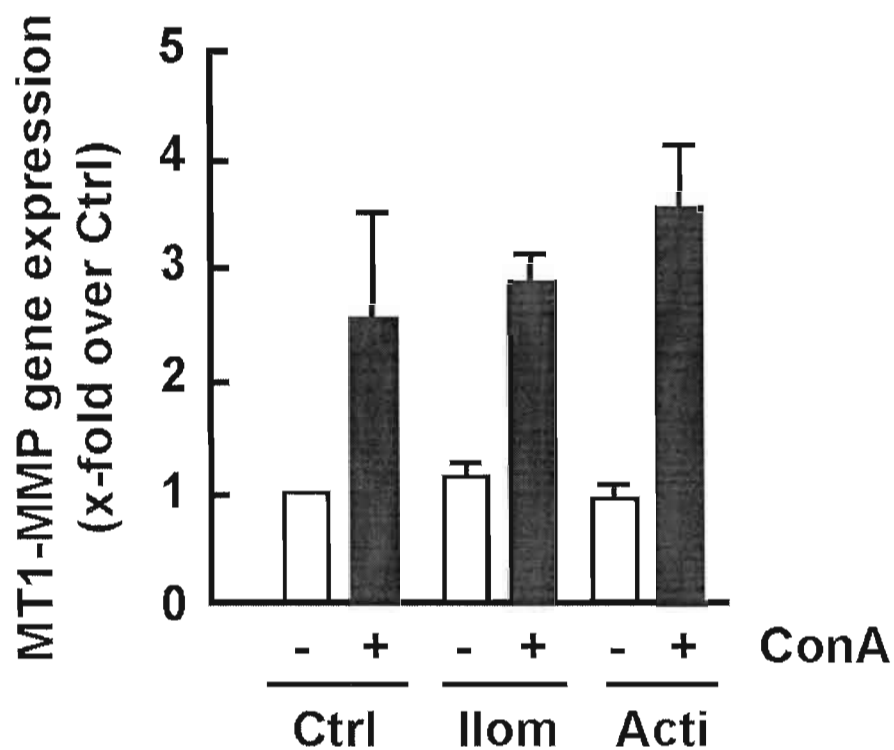


Figure 2: Actinonin does not inhibit concanavalin-A-induced MT1-MMP gene expression. Serum-starved U87 glioma cells were treated (black bars) or not (white bars) with 30 μ g/ml ConA for 18 hours and total RNA was isolated as described in the Methods section. MT1-MMP gene expression was assessed using qRT-PCR.

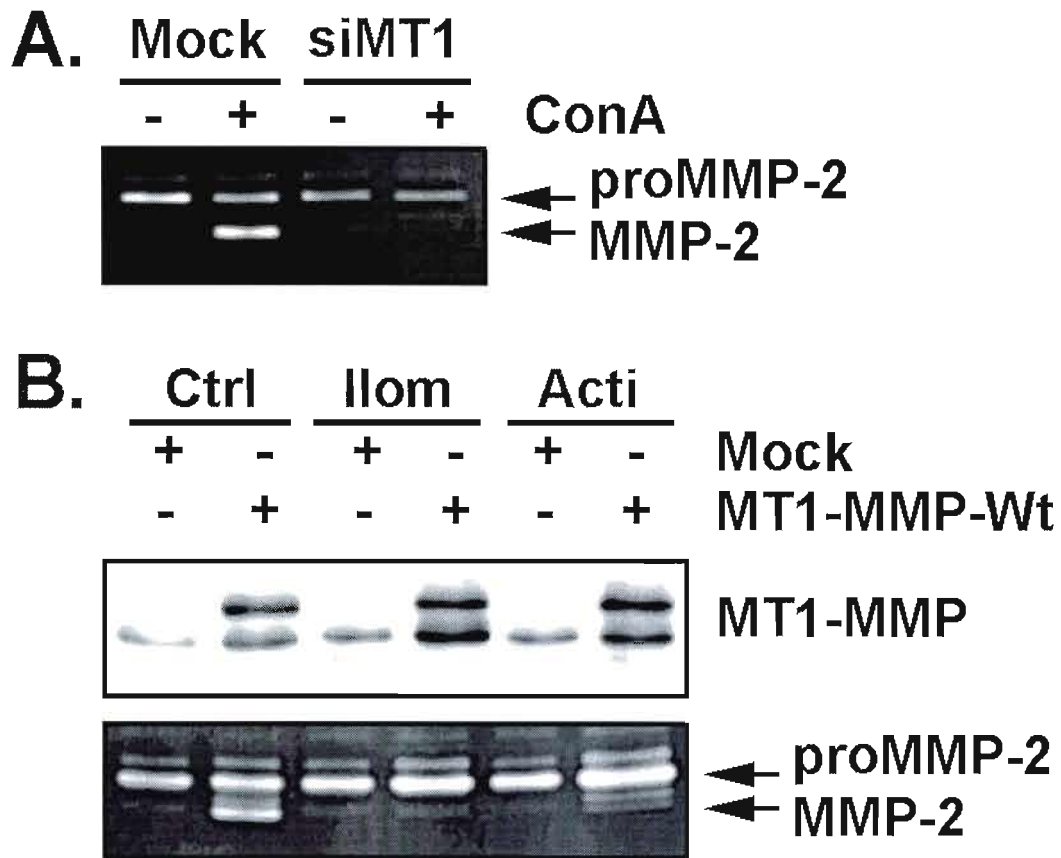


Figure 3: Actinonin inhibits recombinant MT1-MMP-induced proMMP-2 activation. Silencing of MT1-MMP gene expression in U87 glioma cells was performed as described in the Methods section. (A) Serum-starved mock-transfected and siMT1-MMP-transfected (siMT1) cells were treated (or not) with 30 μ g/ml ConA and the extent of proMMP-2 activation was assessed by gelatin zymography. (B) Transient transfection of U87 glioma cells with a cDNA plasmid encoding MT1-MMP was performed as described in the Methods section. Serum-starved cells were then treated with either 25 μ M ilomastat (Ilo) or 25 μ M actinonin (Acti) for 18 hours. Constitutive expression of recombinant MT1-MMP protein in transfected cells was confirmed by western blotting (upper panel), while recombinant MT1-MMP-mediated activation of proMMP-2 was assessed by gelatin zymography from the isolated conditioned media (lower panel).

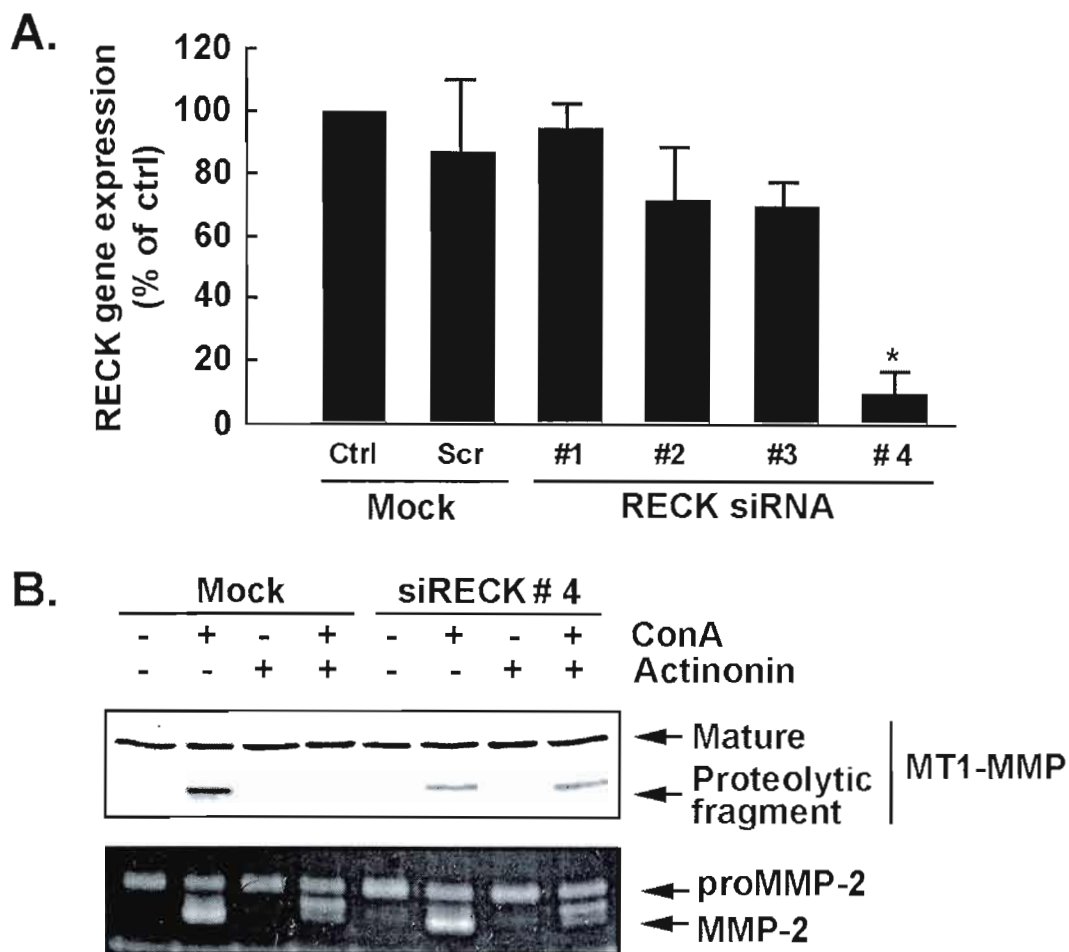


Figure 4: Gene silencing of RECK prevents concanavalin-A-induced MT1-MMP proteolytic activation. (A) Silencing of RECK gene expression in U87 glioma cells was performed as described in the Methods section and RECK gene expression assessed by qRT-PCR (Scr, scrambled sequence). (B) Serum-starved mock-transfected and siRECK-transfected (siRECK) cells were treated (or not) with 30 μ g/ml ConA or with 25 μ M actinonin (Acti) for 18 hours. Plasma membrane preparation was performed and the extent of MT1-MMP proteolytic processing assessed by western blotting (upper panel), while proMMP-2 activation was assessed by gelatin zymography (lower panel).

3.2. The lectin concanavalin-A signals MT1-MMP catalytic independent induction of COX-2 through an IKK γ /NF- κ B-dependent pathway

Asmaa Sina¹, Sébastien Proulx-Bonneau¹, Alain Roy¹, Laurent Poliquin¹ Jian Cao² and Borhane Annabi¹

¹*Centre de Recherche BioMED, Université du Québec à Montréal, Québec, Canada, and*

²*Department of Medicine, State University of New York, Stony Brook, NY 11794, USA*

Article publié dans le journal scientifique *Journal of Cell Communication and Signaling*

**The lectin concanavalin-A signals MT1-MMP catalytic independent induction of COX-2
through an IKK γ /NF- κ B-dependent pathway**

Asmaa Sina¹, Sébastien Proulx-Bonneau¹, Alain Roy¹, Laurent Poliquin¹, Jian Cao² and
Borhane Annabi¹

¹*Centre de Recherche BioMED, Université du Québec à Montréal, Québec, Canada, and*

²*Department of Medicine, State University of New York, Stony Brook, NY 11794, USA*

Correspondence should be directed to: Borhane Annabi

Laboratoire d'Oncologie Moléculaire

Département de Chimie

Université du Québec à Montréal

C.P. 8888, Succ. Centre-ville

Montréal, Québec

CANADA

H3C 3P8

Phone: (514) 987-3000 ext. 7610

Fax: (514) 987-0246

E-mail: annabi.borhane@uqam.ca

Number of figures: 5

Abstract

The lectin from *Canavalia ensiformis* (Concanavalin-A, ConA), one of the most abundant lectins known, enables one to mimic biological lectin/carbohydrate interactions that regulate extracellular matrix protein recognition. As such, ConA is known to induce membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) which expression is increased in brain cancer. Given that MT1-MMP correlated to high expression of cyclooxygenase (COX)-2 in gliomas with increasing histological grade, we specifically assessed the early proinflammatory cellular signaling processes triggered by ConA in the regulation of COX-2. We found that treatment with ConA or direct overexpression of a recombinant MT1-MMP resulted in the induction of COX-2 expression. This increase in COX-2 was correlated with a concomitant decrease in phosphorylated AKT suggestive of cell death induction, and was independent of MT1-MMP's catalytic function. ConA- and MT1-MMP-mediated intracellular signaling of COX-2 was also confirmed in wild-type and in Nuclear Factor-kappaB (NF- κ B) p65^{-/-} mutant mouse embryonic fibroblasts (MEF), but was abrogated in NF- κ B1 (p50)^{-/-} and in I kappaB kinase (IKK) γ ^{-/-} mutant MEF cells. Collectively, our results highlight an IKK/NF- κ B-dependent pathway linking MT1-MMP-mediated intracellular signaling to the induction of COX-2. That signaling pathway could account for the inflammatory balance responsible for the therapy resistance phenotype of glioblastoma cells, and prompts for the design of new therapeutic strategies that target cell surface carbohydrate structures and MT1-MMP-mediated signaling.

Key words: Concanavalin-A / Inflammation / Cyclooxygenase / MT1-MMP / Cancer

Concise summary: Concanavalin-A (ConA) mimics biological lectin/carbohydrate interactions that regulate the proinflammatory phenotype of cancer cells through yet undefined signaling. Here we highlight an IKK/NF- κ B-dependent pathway linking MT1-MMP-mediated intracellular signaling to the induction of cyclooxygenase-2, and that could be responsible for the therapy resistance phenotype of glioblastoma cells.

The abbreviations used are: ConA, concanavalin-A; COX, cyclooxygenase; ECM, extracellular matrix; IKK, I kappaB kinase; MEF, mouse embryonic fibroblasts; MT1-MMP, membrane type-1 matrix metalloproteinase; NF- κ B, nuclear factor kappaB.

Introduction

Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMP) constitute a growing subclass of MMP (Fillmore et al., 2001). The expression levels of several members of the MMP family have been shown to correlate with the graded level of gliomas, including that of MT1-MMP, the best-characterized MT-MMP. While most of the MMPs are secreted, the MT-MMPs are membrane-associated and a number of these have cytoplasmic domains which were recently shown to bear important functions in cellular signaling (Gingras et al., 2001; Annabi et al., 2004; Belkaid et al., 2007). Aside from its well-known roles in the activation of proMMP-2 and in intrinsic proteolytic activity towards extracellular matrix (ECM) molecules, many new functions of MT1-MMP have recently been associated with PGE₂-induced angiogenesis (Alfranca et al., 2008), platelet-mediated calcium mobilization (Fortier et al., 2008a), regulation of cell death/survival bioswitch (Belkaid et al., 2007; Fortier et al., 2008b), and radioresistance in both glioma cells (Wild-Bode et al., 2001; Wick et al., 2002) and endothelial cells (Annabi et al., 2003). The recent demonstration that MT1-MMP also plays a role in medulloblastoma CD133(+) neurosphere-like formation (Annabi et al., 2008) and in CD133(+) glioblastoma invasiveness (Annabi et al., 2009) reinforces the need to design new therapeutic strategies that either directly target MT1-MMP expression/functions or its associated downstream signaling.

Tetra- and hexavalent mannosides were recently demonstrated to specifically target MT1-MMP pleiotropic functions in cell survival, proliferation, and ECM degradation (Fortier et al., 2008b). These glycocluster constructions may therefore serve in carbohydrate-based anticancer strategies since transformed cells express selective carbohydrate motifs in the form of glycoproteins or glycolipids (Danishefsky and Allen, 2000; Roy, 2004; Verez-Bencomo et al., 2004). Interactions between carbohydrate-binding proteins (lectins) and the oligosaccharide moieties of glycoprotein at the cell surfaces are, in fact, involved in extensive cellular recognition processes including development, differentiation, morphogenesis and cell migration. The lectin from *Canavalia ensiformis* (Concanavalin-A, ConA), one of the most abundant lectins known (Lin and Levitan, 1991), enables one to mimic biological lectin/carbohydrate interactions that regulate extracellular matrix (ECM) protein recognition

and, as such, is routinely used to trigger MT1-MMP-mediated activation of latent proMMP-2 (Yu et al., 1997; Zucker et al., 2002; Lafleur et al., 2006). ConA was also found to increase the sub-G1 cell cycle phase as well as cell death; indicative of a potential role in cell surface clustering that affects cell survival (Currie et al., 2007; Fortier et al., 2008b). Furthermore, MT1-MMP gene silencing significantly abrogated chemotaxis in response to the tumorigenic growth factor sphingosine 1-phosphate in mesenchymal stromal cells, again suggesting a crucial role for that MMP in transducing intracellular signaling processes (Currie et al., 2007; Annabi et al., 2003b).

In human glioblastoma, COX-2 performs important functions in tumorigenesis (Deininger et al., 1999) and inhibitors of eicosanoid biosynthesis have been shown to suppress cell proliferation and to promote astrocytic differentiation (Wilson et al., 1990). Since the COX-2 protein is overexpressed in the majority of gliomas, it is therefore considered an attractive therapeutic target (New, 2004; Sminia et al., 2005). Paradoxically, the effectiveness of direct COX-2 inhibitors on glioma cell proliferation and radioresponse enhancement was also found to be independent of COX-2 protein expression (Kuipers et al., 2007). This evidence suggests that alternate initiator molecules, possibly involving some cell surface transducing mechanisms, are associated with therapy resistance and are involved in the regulation of COX-2 expression. Whether any cell surface carbohydrate structures are involved in such regulation remains unclear.

In the present study, we provide evidence of cell surface carbohydrate involvement and identified MT1-MMP as a candidate in the early signaling cascade regulating COX-2 expression. As such, the use of the lectin ConA, as a MT1-MMP-inducing agent, further documents an IKK/NF- κ B-dependent pathway linking MT1-MMP-mediated intracellular signaling to proinflammatory COX-2 expression that could mimic for the cell survival and inflammatory balance responsible of the therapy resistance phenotype of glioblastoma cells.

Materials and Methods

Materials: Sodium dodecylsulfate (SDS) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma (Oakville, ON). Cell culture media was obtained from Invitrogen (Burlington, ON). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON). The enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were from Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, QC). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Pierce (Rockford, IL). The polyclonal antibody against COX-2 was from Advanced Immunochemical Inc. (Long Beach, CA). The polyclonal antibody against MT1-MMP (AB815) was from Chemicon (Temecula, CA). The polyclonal antibodies against AKT and phosphorylated-AKT were purchased from Cell Signaling (Danvers, MA). Horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit and anti-mouse IgG secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). All other reagents were from Sigma-Aldrich Canada.

Cell culture: The human U87 glioblastoma cell line was purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA) and was maintained in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) containing 10% (v/v) calf serum (CS) (HyClone Laboratories, Logan, UT), 2 mM glutamine, 100 units/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin. Cells were incubated at 37°C with 95% air and 5% CO₂. Murine embryo fibroblasts (MEFs) were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium containing 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml of penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 25 ng/ml of amphotericin B (Invitrogen, Carlsbad, CA). MEFs deficient in IKK α (Hu et al., 1999), IKK β (Li et al., 1999), and IKK γ /Nemo (Makris et al., 2000) were described previously and were kindly provided by Dr Terence Dermody (Vanderbilt University, USA).

Cell transfection method: Sub-confluent U87 cell monolayers were transiently transfected with 10 µg of a vector containing cDNA encoding full length (Wt) MT1-MMP fused to GFP (Belkaid et al., 2007) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Burlington, ON). Mock transfections of U87 cultures with the empty vector, pcDNA (3.1+), were used as controls. Transfected cells were left to recuperate and were used 48 hrs post-transfection. MT1-MMP

specific gene expression and function was evaluated by immunoblotting procedures, and was validated by assessing MT1-MMP-mediated proMMP-2 activation using gelatin zymography.

Gelatin zymography: Gelatin zymography was used to assess the extracellular levels of proMMP-2 and MMP-2 activities. Briefly, an aliquot (20 μ l) of the culture medium was subjected to SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in a gel containing 0.1 mg/ml gelatin. The gels were then incubated in 2.5% Triton X-100 and rinsed in nanopure distilled H₂O. Gels were further incubated at 37°C for 20 hrs in 20 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.02% Brij-35, 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6 and then stained with 0.1% Coomassie Brilliant blue R-250 and destained in 10% acetic acid, 30% methanol in H₂O. Gelatinolytic activity was detected as unstained bands on a blue background.

Immunoblotting procedures: Proteins from control and treated cells were separated by SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes which were then blocked for 1 hr at room temperature with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) containing 0.3% Tween-20 (TBST). Membranes were further washed in TBST and incubated with the primary antibodies (1/1,000 dilution) in TBST containing 3% bovine serum albumin, followed by a 1 hr incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG (1/2,500 dilution) in TBST containing 5% non-fat dry milk. Immunoreactive material was visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences, Baie d'Urfée, QC).

Results

Concanavalin-A triggers proMMP-2 activation, MT1-MMP and COX-2 expression

Concanavalin-A (ConA) is a well-documented lectin which, through its binding to carbohydrate moieties on cell surface proteins, elicits very efficient *in vitro* induction of MT1-MMP expression (Belkaid et al., 2007; Fortier et al., 2008b; Sina et al., 2009). Serum-starved U87 glioblastoma cells were therefore treated with increasing concentrations of ConA and the levels of proMMP-2 activation were assessed in the conditioned media by gelatin zymography as described in the Methods section. ProMMP-2 activation into MMP-2 was observed (Fig.1a), and this was accompanied by MT1-MMP and COX-2 protein expression, as assessed in the cell lysates by Western Blotting (Fig.1a). When MT1-MMP expression was plotted against that of COX-2, positive linear correlation ($r^2=0.92$) was observed following treatment of the cells with the different ConA concentrations (Fig.1b). Immunodetection of total and phosphorylated AKT was also performed on those same ConA-treated cells. ConA dose-dependently decreased the basal levels of phosphorylated AKT, though not the total AKT protein expression (Fig.1a). AnnexinV-PI staining and flow cytometry analysis following treatment with ConA confirmed cell death induction through necrosis (data not shown) in agreement with previous reports (Belkaid et al., 2007; Currie et al., 2007). An inverse correlation ($r^2=0.91$) was also observed between the extent of AKT phosphorylation status and COX-2 expression (Fig.1c).

Concanavalin-A-induced COX-2 expression is independent of MT1-MMP's catalytic function

In order to address which MT1-MMP protein domain is responsible for the ConA-induced COX-2 expression, U87 cells were treated with or without Ilomastat, a broad range MMP inhibitor known to target the MT1-MMP extracellular domain catalytic functions (Currie et al., 2007). While Ilomastat, as expected, inhibited the MT1-MMP-mediated proMMP-2 activation into MMP-2 (Fig.2a), it was unable to significantly reverse ConA-induced MT1-MMP and COX-2 expression (Fig.2b). These observations suggest that MT1-MMP's extracellular catalytic domain is not involved in the COX-2 induction process. Cell-based

evidence for the aminopeptidase N/CD13 inhibitor actinonin's targeting of MT1-MMP-mediated proMMP-2 activation was also recently demonstrated (Sina et al., 2009). Similar to Ilomastat, actinonin was found to dose-dependently inhibit ConA-induced proMMP-2 activation (Fig.3a), while it had no effects on ConA-induced MT1-MMP and COX-2 expression (Fig.3b).

Constitutive recombinant MT1-MMP expression triggers COX-2 expression

In order to rule out any alternative signaling driven by ConA, we transiently transfected U87 cells with a cDNA plasmid encoding recombinant MT1-MMP/GFP (Belkaid et al., 2007). Efficient overexpression of the MT1-MMP recombinant form yielded a higher molecular weight band (figure 4, top panel) and led to COX-2 expression (Fig.4, middle panel). Again, the MMP catalytic function inhibitors were unable to reverse MT1-MMP-mediated COX-2 expression although they were still efficient in inhibiting MT1-MMP-mediated proMMP-2 activation (Fig.4). This demonstrates an alternate role, i.e. in intracellular signaling inducing COX-2, as a new function for the cell surface MT1-MMP.

Concanavalin-A- and recombinant MT1-MMP-mediated COX-2 induction requires an intact NF- κ B p50 and IKK γ signaling axis

COX-2 transcriptional expression is thought to be regulated, in part, through NF- κ B-mediated signaling involving nuclear translocation of the NF- κ B heterodimer p50:p65 (Tsatsanis et al., 2006). In an attempt to elucidate the NF- κ B signaling axis needed to trigger COX-2 expression, wild-type mouse embryonic fibroblasts (MEF), p50^{-/-} and p65^{-/-} NF- κ B MEF mutants were used, as were IKK α ^{-/-}, IKK β ^{-/-}, and IKK γ ^{-/-}. Cells were either treated with ConA or transfected with a cDNA plasmid encoding MT1-MMP. Cell lysates as well as conditioned media were isolated following these treatments. ConA triggered a strong activation of proMMP-2 in Wt, p50^{-/-}, p65^{-/-}, and IKK γ ^{-/-} cells, while it was lower in IKK α ^{-/-} and IKK β ^{-/-} cells (Fig.5a). ConA treatment concomitantly induced COX-2 expression in all cell lines except the p50^{-/-} and IKK α ^{-/-} MEF mutants (Fig.5a). Expression and cell surface activity of the recombinant MT1-MMP were also confirmed in transfected cells as Wt, p50^{-/-},

p65^{-/-}, and IKK γ ^{-/-} cells all exhibited significantly increased proMMP-2 activation into active MMP-2 form, as judged by gelatin zymography (Fig.5b). Low but detectable proMMP-2 activation was achieved in IKK α ^{-/-} and IKK β ^{-/-} cells (Fig.5b). When COX-2 protein expression was measured, we observed the induction of COX-2 by recombinant MT1-MMP in Wt-MEF (Fig.5b), confirming the results observed in U87 glioma cells (Fig.4a). Similar MT1-MMP-mediated COX-2 induction was also observed in p65^{-/-}, IKK α ^{-/-}, and IKK β ^{-/-} mutant MEF, while COX-2 expression was completely abrogated in p50^{-/-} and in IKK γ ^{-/-} mutant MEF (Fig.5b). This cell-based evidence directly demonstrates the specific involvement of p50 and of IKK γ in NF- κ B-mediated MT1-MMP regulation of COX-2 expression.

Discussion

Dysregulated NF- κ B activity occurs in a number of chronic inflammatory diseases and certain types of cancers, making NF- κ B signaling an attractive target for the development of anti-inflammatory and anti-cancer drugs. A pivotal regulator of all inducible NF- κ B signaling pathways is the I κ B kinase (IKK) complex that consists of two kinases (IKK α and IKK β) and a regulatory subunit named NF- κ B essential modulator (NEMO, or IKK γ). In the present study, we have identified an IKK γ /NF- κ B-dependent pathway that links ConA-induced MT1-MMP intracellular signaling to COX-2 expression in two cellular models, the U87 glioblastoma cells and the mouse embryonic fibroblasts. An NF- κ B-mediated induction of MT1-MMP had already been demonstrated in human dermal fibroblasts, and this was promoted by TNF- α (Han et al., 2001). More recently, IKK γ was shown to regulate an early NF- κ B-independent cell-death checkpoint during TNF signaling (Legarda-Addison et al., 2009), supporting molecular signaling interplay between MT1-MMP and COX-2 and which likely regulates cell survival status.

Aside from glioblastoma cells, such a link has also been observed in cells derived from malignant fibrous histiocytoma, one of the highest-grade sarcomas arising in bone and soft tissue, where concomitantly increased levels of expression of COX-2 and MT1-MMP were described (Maeda et al., 2008). Co-distribution of MT1-MMP, MMP-2 and COX-2 was also demonstrated in grade IV atheroma, again indicating a possible link between these enzymes in the destabilization of atherosclerotic plaques (Kuge et al., 2007). Altogether, these published data support a molecular signaling convergence linking MT1-MMP to COX-2 expression through an NF- κ B-mediated pathway which may constitute the point of convergence of many oncogenic pathways by virtue of its ability to regulate the expression of genes involved in cell apoptosis, differentiation, adhesion, and survival (Dolcet et al., 2005). Aside from its critical role in the development of human cancer, NF- κ B has also been implicated at the molecular level in the promotion of angiogenesis, which is of particular interest since malignant astrocytomas are highly vasculated tumors (Korkolopoulou et al., 2008). NF- κ B is also a transcriptional regulator in the inducible expression of numerous genes including COX-2 (Lim et al., 2001). Interestingly, a consensus binding site for NF- κ B

p65 (TGGAGCTTCC) was found in the 5'-flanking region of the human MT1-MMP gene (Han et al., 2001) and NF- κ B-mediated induction of MT1-MMP was confirmed in murine melanoma cells (Philip et al., 2001) and in human fibrosarcoma cells (Park et al., 2007). Further studies also implicated NF- κ B as a potentially critical factor in astrocytic tumorigenesis and astrocytoma progression through analysis of cell lines and preclinical models (Nagai et al., 2002; Hayashi et al., 2001; Yamamoto et al., 2000). In the current study, we provide evidence for an MT1-MMP-mediated signaling cascade that leads to activation of COX-2 expression and that is independent of MT1-MMP's catalytic function. We also demonstrate that this new MT1-MMP/COX-2 signaling axis absolutely requires IKK γ /NF- κ B p50. In support of our results, an increase in NF- κ B p50 was recently found to rapidly induce MT1-MMP expression in trabecular meshwork cells (Miller et al., 2007).

Gliomas remain a great challenge in oncology as they account for more than 50% of all brain tumors and are by far the most common primary brain tumors in adults (Stewart et al., 2002). More importantly, the mechanisms responsible for the resistance of migrating glioblastoma cells to chemotherapy or to radiation-induced cell death have long been recognized (Berens et al., 1999) and still receive much attention in order to optimize future cellular targets for the treatment of glioblastomas (Lefranc et al., 2005). In addition, tissue necrosis is a characteristic feature of malignant gliomas, in particular glioblastoma, and is most likely the consequence of rapidly increasing tumor mass that is inadequately oxygenated by the pre-existing vasculature (Raza et al., 2002). At the cellular level, maintenance of cytoarchitecture is required for cell survival, since its perturbation by Cytochalasin-D- or ConA-mediated MT1-MMP mechanisms diminishes cell survival and has been correlated with proMMP-2 activation (Belkaid et al., 2007; Hinoue et al., 2005; Preaux et al., 2002; this study). Accordingly, MT1-MMP's intracellular domain was shown to be an absolute requirement for transducing the intracellular signaling that leads to cell death since overexpression of a membrane-bound catalytically active but cytoplasmic domain-deleted MT1-MMP was unable to trigger necrosis (Belkaid et al., 2007). Although the exact identity of the amino acid residues from the MT1-MMP intracellular domain remain to be identified, speculation about Tyr-573, Cys-574, and Val-582 have been put forward as important for MT1-MMP signaling (Labrecque et al., 2004; Anilkumar et al., 2005). Similarly, a caspase-dependent mechanism

has recently been associated with MT1-MMP function in endothelial cell morphogenic differentiation (Langlois et al., 2005). This suggests that MT1-MMP acts as a potential cell death sensor/effector that signals ECM degradation processes to be activated.

In summary, the use of ConA proves that cell surface carbohydrate structures account for MT1-MMP intracellular signaling that regulates COX-2 expression through an IKK γ /NF- κ B-dependent pathway in U87 glioblastoma cells. By revealing such a new signaling axis in tumor cells, profiling studies will be needed in order to enable drug developers to more efficiently target those pathways, thus aiding the identification of new anti-cancer lead compounds.

Acknowledgments

BA holds a Canada Research Chair in Molecular Oncology from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). AS is a Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) awardee. SPB is a Fonds de Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT) awardee. This study was funded by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to BA.

References

- Alfranca, A., López-Oliva, J.M., Genís, L., López-Maderuelo, D., Mirones, I., Salvado, D., Quesada, A.J., Arroyo, A.G., and Redondo, J.M. (2008) PGE2 induces angiogenesis via MT1-MMP-mediated activation of the TGFbeta/Alk5 signaling pathway. *Blood* 112, 1120-1128.
- Anilkumar, N., Uekita, T., Couchman, J.R., Nagase, H., Seiki, M., and Itoh, Y. (2005) Palmitoylation at Cys574 is essential for MT1-MMP to promote cell migration. *FASEB J.* 19, 1326-1328.
- Annabi, B., Lee, Y.T., Martel, C., Pilorget, A., Bahary, J.P., and Béliveau, R. (2003a) Radiation induced-tubulogenesis in endothelial cells is antagonized by the antiangiogenic properties of green tea polyphenol (-) epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Biol Ther.* 2, 642-649.
- Annabi, B., Thibeault, S., Lee, Y.T., Bousquet-Gagnon, N., Eliopoulos, N., Barrette, S., Galipeau, J., and Beliveau, R. (2003b). Matrix metalloproteinase regulation of sphingosine-1-phosphate-induced angiogenic properties of bone marrow stromal cells. *Exp. Hematol.* 31, 640-649.
- Annabi, B., Thibeault, S., Moumdjian, R., and Béliveau, R. (2004) Hyaluronan cell surface binding is induced by type I collagen and regulated by caveolae in glioma cells. *J Biol Chem.* 279, 21888-21896.
- Annabi, B., Rojas-Sutterlin, S., Laflamme, C., Lachambre, M.P., Rolland, Y., Sartelet, H., and Béliveau, R. (2008) Tumor environment dictates medulloblastoma cancer stem cell expression and invasive phenotype. *Mol Cancer Res.* 6, 907-916.
- Annabi B., Lachambre M.P., Plouffe K., Sartelet H., and Béliveau R. (2009) Modulation of invasive properties of CD133+ glioblastoma stem cells: a role for MT1-MMP in bioactive lysophospholipid signaling. *Mol Carcinog.*, 48, 910-919.
- Belkaid, A., Fortier, S., Cao, J., and Annabi, B. (2007) Necrosis induction in glioblastoma cells reveals a new "bioswitch" function for the MT1-MMP/G6PT signaling axis in proMMP-2 activation versus cell death decision. *Neoplasia* 9, 332-430.
- Berens, M.E., and Giese, A. (1999) "...those left behind." Biology and oncology of invasive glioma cells. *Neoplasia.* 1, 208-219.
- Currie, J.C., Fortier, S., Sina, A., Galipeau, J., Cao, J., and Annabi, B. (2007) MT1-MMP down-regulates the glucose 6-phosphate transporter expression in marrow stromal cells: a molecular link between pro-MMP-2 activation, chemotaxis, and cell survival. *J Biol Chem.* 282, 8142-8149.

Danishefsky, S.J., and Allen, J.R. (2000). From the Laboratory to the Clinic: A Retrospective on Fully Synthetic Carbohydrate-Based Anticancer Vaccines Frequently used abbreviations are listed in the appendix. *Angew. Chem. Int. Ed.* 39, 836-863.

Deininger, M.H., Weller, M., Streffer, J., Mittelbronn, M., and Meyermann, R. (1999) Patterns of cyclooxygenase-1 and -2 expression in human gliomas in vivo. *Acta Neuropathol.* 98, 240-244.

Dolcet, X., Llobet, D., Pallares, J., and Matias-Guiu, X. (2005) NF- κ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch* 446, 475-482.

Fillmore, H.L. VanMeter, T.E., and Broaddus, W.C. (2001) Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs): expression and function during glioma invasion. *J Neurooncol.* 53, 187-202.

Fortier, S., Labelle, D., Sina, A., Moreau, R., and Annabi, B. (2008a) Silencing of the MT1-MMP/ G6PT axis suppresses calcium mobilization by sphingosine-1-phosphate in glioblastoma cells. *FEBS Lett.* 582, 799-804.

Fortier, S., Touaibia, M., Lord-Dufour, S., Galipeau, J., Roy, R., and Annabi, B. (2008b) Tetra- and hexavalent mannosides inhibit the pro-apoptotic, antiproliferative and cell surface clustering effects of concanavalin-A: impact on MT1-MMP functions in marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Glycobiology* 18, 195-204.

Gingras, D. Bousquet-Gagnon, N., Langlois, S., Lachambre, M.P., Annabi, B., and Béliveau R. (2001) Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade by membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *FEBS Lett.* 507, 231-236.

Han, Y.P., Tuan, T.L., Wu, H., Hughes, M., and Garner, W.L. (2001) TNF- α stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(κ)B mediated induction of MT1-MMP. *J Cell Sci.* 114, 131-139.

Hayashi, S., Yamamoto, M., Ueno, Y., Ikeda, K., Ohshima, K., Soma, G., and Fukushima, T. (2001) Expression of nuclear factor-kappa B, tumor necrosis factor receptor type 1, and c-Myc in human astrocytomas. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 41, 187-195.

Hinoue, A., Takigawa, T., Miura, T., Nishimura, Y., Suzuki, S., and Shiota, K. (2005) Disruption of actin cytoskeleton and anchorage-dependent cell spreading induces apoptotic death of mouse neural crest cells cultured in vitro. *Anat Rec. A Discov Mol Cell Evol Biol.* 282, 130-137.

Hu., Y., Baud, V., Delhase, M., Zhang, P., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R., and Karin, M. (1999) Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKK α subunit of IkappaB kinase. *Science* 284, 316-320.

Korkolopoulou, P., Levidou, G., Saetta, A.A., El-Habr, E., Eftichiadis, C., Demenagas, P., Thymara, I., Xiromeritis, K., Boviatsis, E., Thomas-Tsagli, E., Panayotidis, I., and Patsouris, E. (2008) Expression of nuclear factor-kappaB in human astrocytomas: relation to pI kappa Ba, vascular endothelial growth factor, Cox-2, microvascular characteristics, and survival. *Hum Pathol.* 39, 1143-1152.

Kuge, Y., Takai, N., Ishino, S., Temma, T., Shiomi, M., and Saji, H. (2007) Distribution profiles of membrane Type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in rabbit atherosclerosis: comparison with plaque instability analysis. *Biol Pharm Bull.* 30, 1634-1640.

Kuipers, G.K., Slotman, B.J., Wedekind, L.E., Stoter, T.R., Berg, J., Sminia, P., and Lafleur, M.V. (2007) Radiosensitization of human glioma cells by cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition: independent on COX-2 expression and dependent on the COX-2 inhibitor and sequence of administration. *Int J Radiat Biol.* 83, 677-685.

Labrecque, L., Nyalendo, C., Langlois, S., Durocher, Y., Roghi, C., Murphy, G., Gingras, D., and Béliveau, R. (2004) Src-mediated tyrosine phosphorylation of caveolin-1 induces its association with membrane type 1 matrix metalloproteinase. *J Biol Chem.* 279, 52132-52140.

Lafleur, M.A., Mercuri, F.A., Ruangpanit, N., Seiki, M., Sato, H., and Thompson, E.W. (2006). Type I collagen abrogates the clathrin-mediated internalization of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) via the MT1-MMP hemopexin domain. *J. Biol. Chem.* 281, 6826-6840.

Langlois, S., Di Tomasso, G., Boivin, D., Roghi, C., Murphy, G., Gingras, D., and Béliveau, R. (2005) Membrane type 1-matrix metalloproteinase induces endothelial cell morphogenic differentiation by a caspase-dependent mechanism. *Exp Cell Res.* 307, 452-464.

Lefranc, F., Brotchi, J., and Kiss, R. (2005) Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. *J Clin Oncol.* 23, 2411-2422.

Legarda-Addison, D., Hase, H., O'Donnell, M.A., and Ting, A.T. (2009) NEMO/IKKgamma regulates an early NF-kappaB-independent cell-death checkpoint during TNF signaling. *Cell Death Differ.* 16, 1279-1288.

Li, Z.W., Chu, W., Hu, Y., Delhase, M., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R., and Karin, M. (1999) The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis. *J. Exp. Med.* 189, 1839-1845.

Lim, J.W., Kim, H., and Kim, K.H. (2001) NF-kappaB, inducible nitric oxide synthase and apoptosis by Helicobacter pylori infection. *Free Radic Biol Med.* 31, 355-366.

Lin, S.S., and Levitan, I.B. (1991). Concanavalin A: a tool to investigate neuronal plasticity. *Trends Neurosci.* 14, 273-277.

Maeda, T., Hashitani, S., Zushi, Y., Segawa, E., Tanaka, N., Sakurai, K., and Urade, M. (2008) Establishment of a nude mouse transplantable model of a human malignant fibrous histiocytoma of the mandible with high metastatic potential to the lung. *J Cancer Res Clin Oncol.* 134, 1005-1011.

Makris, C., Godfrey, V.L., Krahn-Senftleben, G., Takahashi, T., Roberts, J.L., Schwarz, T., Feng, L., Johnson, R.S., and Karin, M. (2000) Female mice heterozygous for IKK gamma/NEMO deficiencies develop a dermatopathy similar to the human X-linked disorder incontinentia pigmenti. *Mol. Cell.* 5, 969-979.

Miller, A.M., Nolan, M.J., Choi, J., Koga, T., Shen, X., Yue, B.Y., Knepper, P.A. (2007) Lactate treatment causes NF-kappaB activation and CD44 shedding in cultured trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48, 1615-1621.

Nagai, S., Washiyama, K., Kurimoto, M., Takaku, A., Endo, S., and Kumanishi, T. (2002) Aberrant nuclear factor-kappaB activity and its participation in the growth of human malignant astrocytoma. *J Neurosurg.* 96, 909-917.

New, P. (2004) Cyclooxygenase in the treatment of glioma: its complex role in signal transduction. *Cancer Control* 11, 152-164.

Park, J.M., Kim, A., Oh, J.H., and Chung, A.S. (2007) Methylseleninic acid inhibits PMA-stimulated pro-MMP-2 activation mediated by MT1-MMP expression and further tumor invasion through suppression of NF-kappaB activation. *Carcinogenesis* 28, 837-847.

Philip, S., Bulbule, A., and Kundu, G.C. (2001) Osteopontin stimulates tumor growth and activation of promatrix metalloproteinase-2 through nuclear factor-kappa B-mediated induction of membrane type 1 matrix metalloproteinase in murine melanoma cells. *J Biol Chem.* 276, 44926-44935.

Preaux, A.M., D'ortho, M.P., Bralet, M.P., Laperche, Y., and Mavier, P. (2002) Apoptosis of human hepatic myofibroblasts promotes activation of matrix metalloproteinase-2. *Hepatology.* 36, 615-622.

Raza, S.M., Lang, F.F., Aggarwal, B.B., Fuller, G.N., Wildrick, D.M., and Sawaya, R. (2002) Necrosis and glioblastoma: a friend or a foe? A review and a hypothesis. *Neurosurgery.* 51, 2-12.

Roy, R. (2004). New trends in carbohydrate-based vaccines. *Drug Discov Today : Technologies* 1, 327-336.

Sina, A., Lord-Dufour, S., and Annabi, B. (2009) Cell-based evidence for aminopeptidase N/CD13 inhibitor actinonin targeting of MT1-MMP-mediated proMMP-2 activation. *Cancer Lett.* 279, 171-176.

Sminia, P., Stoter, T.R., van der Valk, P., Elkhuisen, P.H., Tadema, T.M., Kuipers, G.K., Vandertop, W.P., Lafleur, M.V., and Slotman, B.J. (2005) Expression of cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor in primary and recurrent glioblastoma multiforme. *J Cancer Res Clin Oncol.* 131, 653-661.

Stewart, L.A. (2002) Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet.* 359, 1011-1018.

Tsatsanis, C., Androulidaki, A., Venihaki, M., and Margioris, A.N. (2006) Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. *Int J Biochem Cell Biol.* 38, 1654-1661.

Verez-Bencomo, V., Fernandez-Santana, V., Hardy, E., Toledo, M.E., Rodriguez, M.C., Heynngnezz, L., Rodriguez, A., Baly, A., Herrera, L., Izquierdo, M., Villar, A., Valdes, Y., Cosme, K., Deler, M.L., Montane, M., Garcia, E., Ramos, A., Aguilar, A., Medina, E., Torano, G., Sosa, I., Hernandez, I., Martinez, R., Muzachio, A., Carmenates, A., Costa, L., Cardoso, F., Campa, C., Diaz, M., and Roy, R. (2004). A synthetic conjugate polysaccharide vaccine against *Haemophilus influenzae* type b. *Science* 305, 522-525.

Wick, W., Wick, A., Schulz, J.B., Dichgans, J., Rodemann, H.P., and Weller, M. (2002) Prevention of irradiation-induced glioma cell invasion by temozolomide involves caspase 3 activity and cleavage of focal adhesion kinase. *Cancer Res.* 62, 1915-1919.

Wild-Bode, C., Weller, M., Rimner, A., Dichgans, J., and Wick, W. (2001) Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma. *Cancer Res.* 61, 2744-2750.

Wilson, D.E., Anderson, K.M., and Seed, T.M. (1990) Ultrastructural evidence for differentiation in a human glioblastoma cell line treated with inhibitors of eicosanoid metabolism. *Neurosurgery* 27, 523-531.

Yamamoto, M., Fukushima, T., Hayashi, S., Ikeda, K., Tsugu, H., Kimura, H., Soma, G., and Tomonaga, M. (2000) Correlation of the expression of nuclear factor-kappa B, tumor necrosis factor receptor type 1 (TNFR 1) and c-Myc with the clinical course in the treatment of malignant astrocytomas with recombinant mutant human tumor necrosis factor-alpha (TNF-SAM2). *Anticancer Res* 20, 611-618.

Yu, M., Bowden, E.T., Sitlani, J., Sato, H., Seiki, M., Mueller, S.C., and Thompson, E.W. (1997). Tyrosine phosphorylation mediates ConA-induced membrane type 1-matrix metalloproteinase expression and matrix metalloproteinase-2 activation in MDA-MB-231 human breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 57, 5028-5032.

Zucker, S., Hymowitz, M., Conner, C.E., DiYanni, E.A., and Cao, J. (2002). Rapid trafficking of membrane type 1-matrix metalloproteinase to the cell surface regulates progelatinase a activation. *Lab. Invest.* 82, 1673-1684.

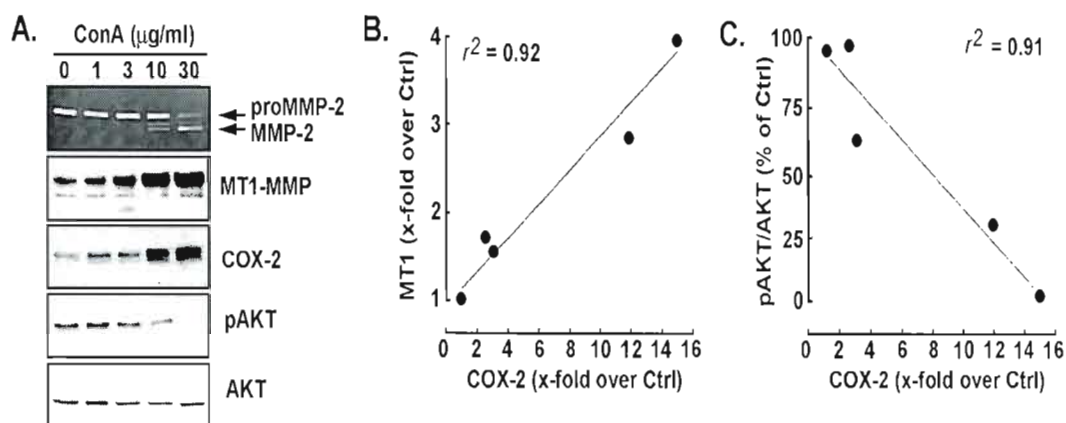


Figure 1: Concanavalin-A triggers proMMP-2 activation, MT1-MMP and COX-2 expression. (A) U87 glioblastoma cells were cultured as described in the Methods section until they reached ~75-90% confluence. They were then serum-starved for 24 hours prior to the addition of increasing concentrations of concanavalin-A (ConA). Gelatin zymography (upper panel) was performed to assess the extent of proMMP-2 activation levels, as described in the Methods section, using conditioned media isolated from each of the serum-starved cells conditions. Cell lysates were isolated and SDS-PAGE performed (20 µg protein/well). MT1-MMP, COX-2, phosphorylated-AKT, and total AKT expression were assessed by Western blotting and immunodetection was performed as described in the Methods section. Scanning densitometry data of the (B) MT1-MMP vs COX-2 and (C) pAKT/AKT vs COX-2 autoradiograms were plotted and are from a representative experiment.

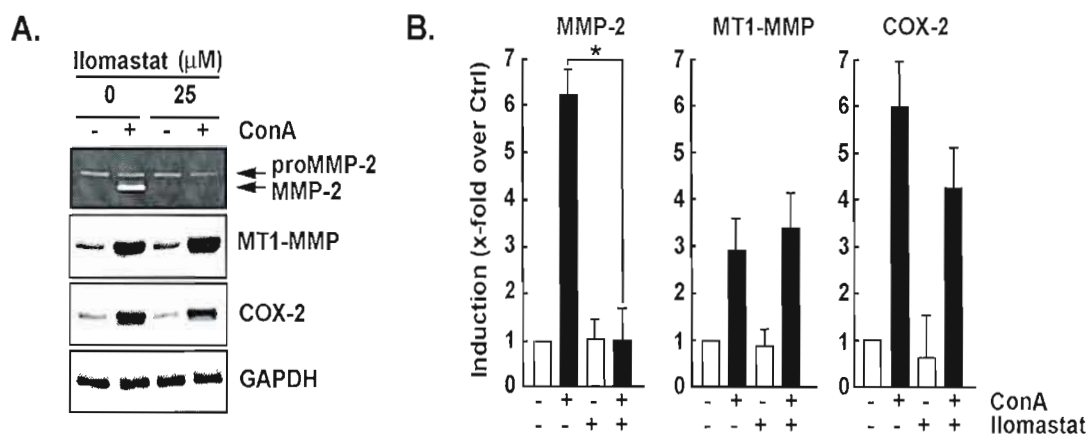


Figure 2: Concanavalin-A-induced COX-2 expression is independent of MT1-MMP's catalytic function. (A) Cell lysates were isolated from U87 glioma cells that had been treated with or without ConA, 10 μ M Ilomastat, or a combination of both. Gelatin zymography (upper panel) was carried out to assess the extent of proMMP-2 activation levels, as described in the Methods section, using conditioned media isolated from each of the serum-starved cell conditions. The extent of MT1-MMP and COX-2 expression were assessed as described in the legend to Fig.1. (B) Scanning densitometry data of MMP-2, MT1-MMP, COX-2 and GAPDH expression were plotted and are from 3 independent experiments.

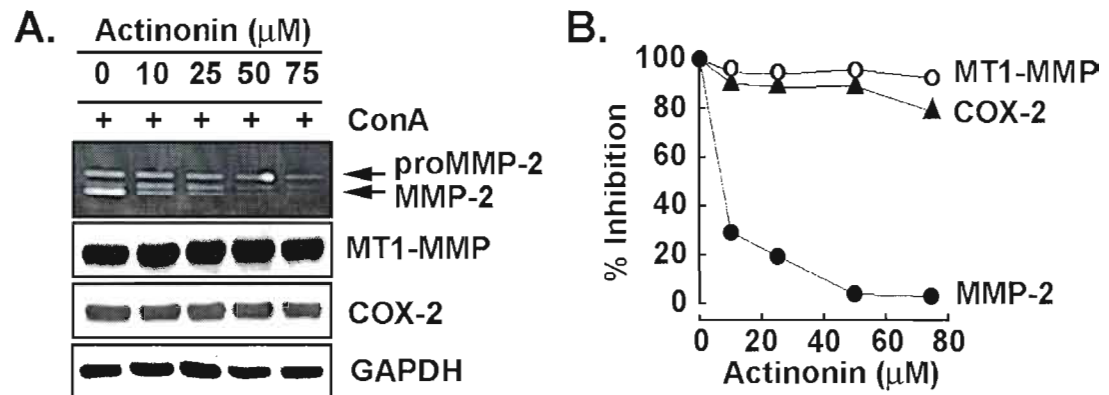


Figure 3: Actinonin is unable to antagonize concanavalin-A-induced COX-2 expression.

(A) Gelatin zymography (upper panel) was carried out to assess the extent of proMMP-2 activation levels, as described in the Methods section, using conditioned media isolated from serum-starved U87 glioblastoma cells that had been treated with increasing actinonin concentrations in the presence of ConA. The extent of MT1-MMP and COX-2 expression was assessed in cell lysates as described in the legend to Fig.1. (B) Scanning densitometry data of the respective MMP-2, MT1-MMP, COX-2 and GAPDH expression were plotted and are from a representative experiment.

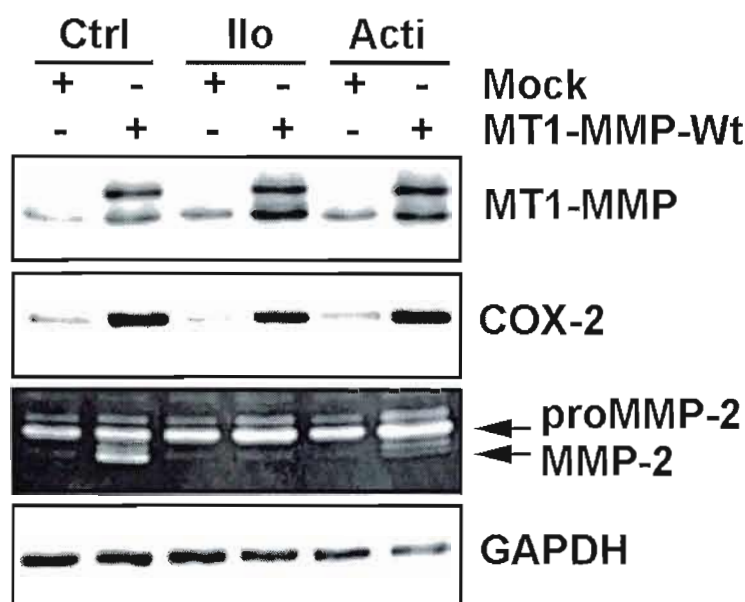


Figure 4: Constitutive recombinant MT1-MMP expression triggers COX-2 expression. U87 glioblastoma cells were either Mock-transfected or transfected with a cDNA plasmid encoding recombinant MT1-MMP/GFP (MT1-MMP-Wt). Cells were then incubated in serum-free media in the presence or absence of Ilomastat (Ilo) or Actinonin (Acti). Gelatin zymography was performed to monitor the extent of latent proMMP-2 and active MMP-2 expression from the conditioned media of the serum-starved cells (lower panel). Cell lysates were isolated and SDS-PAGE performed (20 μ g protein/well), followed by Western blotting and MT1-MMP, COX-2 and GAPDH immunodetection.

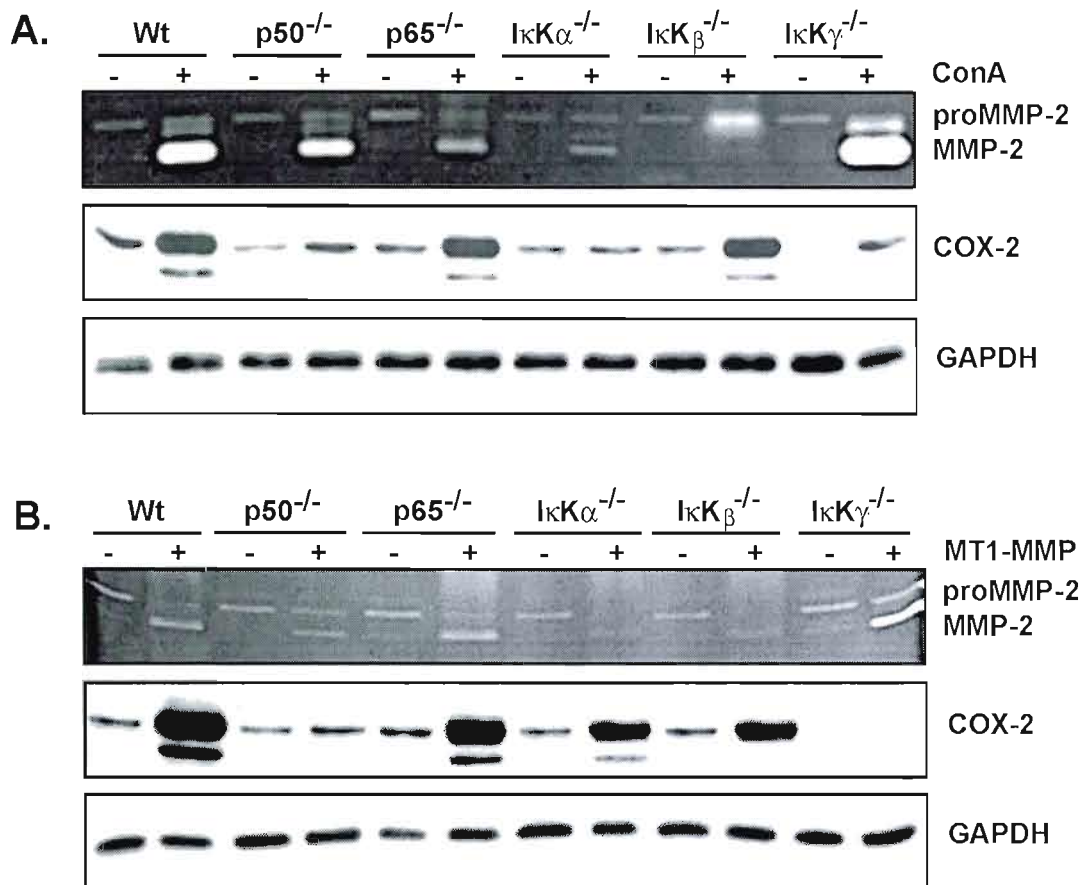


Figure 5: Concanavalin-A- and recombinant MT1-MMP-mediated COX-2 induction necessitates an intact NF- κ B1 p50 and IKK γ signaling axis. Wild-type (Wt), p65^{-/-}, p50^{-/-}, IKK α ^{-/-}, IKK β ^{-/-}, and IKK γ ^{-/-} mouse embryonic fibroblasts (MEF) were either treated with ConA (A), Mock-transfected or transfected with a cDNA plasmid encoding MT1-MMP (B). Gelatin zymography was used to monitor the extent of latent proMMP-2 and active MMP-2 expression from the conditioned media of the serum-starved cells (upper panels of A and B). Cell lysates were isolated and SDS-PAGE performed (20 μ g protein/well), followed by Western blotting and immunodetection of COX-2 and GAPDH.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Les gliomes sont les tumeurs cérébrales les plus invasives et les plus répandues chez l'adulte (Giese et Westphal, 1996 ; Grossman et Batara, 2004). Ils représentent plus de 50% de l'ensemble des tumeurs cérébrales, et leur traitement repose sur l'ablation, la radiothérapie et la chimiothérapie (Gilbert et Loghin, 2005). Cependant, les mécanismes impliqués dans la résistance à la chimiothérapie ou à la radiothérapie des cellules tumorales cérébrales demeurent encore à ces jours obscurs. La participation de MT1-MMP a été clairement mise en évidence comme un contributeur moléculaire dans la radiorésistance des cellules de gliome (Wild-Bode *et al.*, 2001). Ainsi, un traitement avec des molécules anti-cancéreuses ciblant la fonction catalytique ou signalétique de MT1-MMP pourrait agir en synergie avec la radiothérapie et optimiser l'efficacité des traitements d'irradiation des cellules de gliomes. Les études rapportées dans ce mémoire ont permis pour la première fois l'évaluation biologique de l'action spécifique de l'actinonine et sa capacité à inhiber la fonction catalytique de MT1-MMP dans les cellules de glioblastomes humains. Ceci inspirera possiblement à l'utilisation de l'actinonine en combinaison avec l'irradiation pour la sensibilisation des tumeurs cérébrales à la radiothérapie. De plus, notre recherche lève le voile sur un axe de signalisation encore méconnu, soit la transduction de signaux initiés par le domaine cytoplasmique de MT1-MMP menant à l'induction de l'expression de COX-2 via la voie NF- κ B dans les glioblastomes humains (Figure 12). En effet, le dépistage de nouvelles molécules ciblant la fonction signalétique de MT1-MMP combinées à des drogues anti-inflammatoires pourrait avoir également d'importantes répercussions dans l'optimisation des traitements de gliomes.

L'inhibition pharmacologique de MT1-MMP: une stratégie thérapeutique contre le cancer cérébral

Les récents résultats décevants des inhibiteurs synthétiques ciblant la fonction catalytique des MMPs solubles dans des essais cliniques soulèvent la nécessité de se pencher davantage sur les mécanismes d'action des MMPs impliqués dans la croissance du cancer cérébral

(Coussens *et al.*, 2002). Le rôle de MT1-MMP dans la progression tumorale est connu depuis plusieurs années (Fillmore *et al.*, 2001). En effet, la MT1-MMP permet aux cellules tumorales cérébrales d'acquérir un potentiel invasif en amplifiant le processus de dégradation de la MEC par l'activation des MMPs solubles entre autre la proMMP-2 (Egeblad et Werb, 2002). De plus, la MT1-MMP régule à la hausse les facteurs pro-angiogéniques tels le VEGF et le FGF et augmente leur disponibilité. L'action de ces facteurs de croissance, en concert avec l'augmentation de l'expression de la MT1-MMP permettent la migration des cellules endothéliales au lieu de la néovascularisation lors de l'angiogenèse tumorale (Annabi *et al.*, 2003 ; Ingber et Folkman, 1989 ; Lelièvre *et al.*, 1996). Il sera donc intéressant de considérer que l'inhibition pharmacologique de la fonction catalytique de la MT1-MMP pourrait avoir de larges implications thérapeutiques dans le traitement de gliomes.

L'aminopeptidase N (APN/CD13) est une métalloprotéase transmembranaire (Bauvois et Dauzonne, 2006) également surexprimée dans certaines tumeurs solides telles le cancer du rein, de la prostate, le mélanome, et dans les leucémies myéloïdes aiguës et chroniques, et à la surface des cellules endothéliales jouxtant les tumeurs (Kehlen *et al.*, 2003). Des observations *in vitro* et *in vivo* indiquent que l'APN/CD13 des cellules tumorales et endothéliales pourrait contribuer au processus tumoral et à l'angiogenèse associée à la progression de la tumeur en augmentant le taux de prolifération des cellules et/ou en favorisant leur mobilité et leur capacité invasive. En outre, l'utilisation d'un petit ARN interférent (siRNA) dirigé contre le gène de l'APN/CD13 dans les cellules endothéliales a abouti à l'inhibition de la tubulogenèse *in vitro*. Il a été démontré que l'actinonine est l'un des inhibiteurs d'APN/CD13 (Bauvois et Dauzonne, 2006). Cet acide hydroxamique (Figure 13-A) a des effets antiprolifératifs sur des cellules tumorales chez l'homme (Lee *et al.*, 2004), anti-angiogéniques dans le cas de la croissance tumorale, mais pas sur la vascularisation physiologique (Rangel *et al.*, 2007). Une récente étude a identifié l'actinonine comme un inhibiteur sélectif des MMPs. Bien que le test d'inhibition de MMPs a été principalement documenté sur les formes solubles de MMPs, incluant les MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -10, -12 et -13 (Antczak *et al.*, 2008), l'impact de l'actinonine sur les MMPs membranaires restait inconnu. Nos résultats sont les premiers à démontrer le ciblage spécifique de la MT1-MMP

par l'actinonine et la capacité de cet inhibiteur à antagoniser l'activation de la proMMP-2 par MT1-MMP dans les cellules de glioblastomes humains U87.

De ce fait, l'actinonine pourrait compléter l'action anticancéreuse des médicaments cytotoxiques conventionnels pour inhiber la formation de nouveaux vaisseaux sanguins au sein de la tumeur. Il est également possible d'envisager l'utilisation d'une telle molécule pour bloquer le développement de métastases après résection de la tumeur primitive cérébrale. La sélectivité d'action de l'actinonine vis-à-vis de la MT1-MMP, d'une part, et de l'APN/CD13, d'autre part, font de ce composé synthétique un candidat présentant un potentiel thérapeutique intéressant dans le traitement du glioblastome humain.

Nouveau rôle du domaine cytoplasmique de MT1-MMP dans l'expression de Cox-2 dans les gliomes

L'importance de la portion cytoplasmique de MT1-MMP dans la progression tumorale

La MT1-MMP est une protéine transmembranaire contenant, entre autres domaines, un domaine cytoplasmique dont l'importance a été démontrée dans les fonctions telles la migration cellulaire et le processus d'angiogenèse (Figure 14). En effet, l'expression d'un mutant de la MT1-MMP dont le domaine cytoplasmique a été tronqué entrave le processus de migration des cellules tumorales (Gingras *et al.*, 2001 ; Lehti *et al.*, 2000 ; Rozanov *et al.*, 2001 ; Uekita *et al.*, 2001) et empêche la formation de structures de type capillaire des cellules endothéliales *in vitro*, alors que la forme sauvage stimule ces phénomènes (Langlois *et al.*, 2004). De plus, il a été observé que le domaine cytoplasmique de la MT1-MMP interagit avec les tyrosines kinases de la famille Src, et que cette interaction fait suite à la phosphorylation de l'unique résidu tyrosine Tyr⁵⁷³ de la région cytoplasmique de MT1-MMP (Nyalendo *et al.*, 2007). Une mutation de la Tyr⁵⁷³ empêche le recrutement de Src et la phosphorylation subséquente de la région cytoplasmique de MT1-MMP (Nyalendo *et al.*, 2007). La surexpression d'une forme recombinante de ce mutant dans les cellules U87 ne stimule pas la migration cellulaire contrairement à la forme sauvage de MT1-MMP (Nyalendo *et al.*, 2007). Bien que la fonction associée aux résidus d'acides aminés du domaine cytoplasmique de MT1-MMP reste à être identifiée, les spéculations sur la Tyr⁵⁷³ ont

montré l'importance de cet acide aminé pour la signalisation intracellulaire de MT1-MMP (Anilkumar *et al.*, 2005 ; Labrecque *et al.*, 2004). Donc, la phosphorylation de MT1-MMP par Src peut être un événement déclencheur de la transduction de signaux intracellulaires qui contrôlent l'expression de multiples gènes impliqués dans la progression tumorale. En effet, des études ont démontré que la portion cytoplasmique de MT1-MMP active la kinase ERK (Extracellular signal-Regulated protein Kinase), ce phénomène étant important pour la migration cellulaire dépendante de la MT1-MMP (Gingras *et al.*, 2001 ; Takino *et al.*, 2004).

La signature moléculaire commune entre CSC CD133(+) et la population de glioblastome humain U87

Une des avancées majeures en oncologie, depuis quelques années, est la mise en évidence de la présence de cellules souches cancéreuses CD133(+) dans les glioblastomes. Cette sous population de cellules est responsable de l'initiation et du maintien de la tumeur cérébrale (Liu *et al.*, 2006), et est caractérisée par des capacités accrues de défense envers les agents antitumoraux. Un des mécanismes importants dans la résistance aux drogues est l'expression de protéines de la famille des «adenosine triphosphate-binding cassette (ABC) super family». Les membres de la superfamille des ABC sont des pompes dépendantes de l'ATP. Ces transporteurs membranaires peuvent jeter hors de la cellule les molécules de chimiothérapie. Les CSC CD133(+) expriment fortement l'un des membres de cette famille, soient la «breast cancer resistance protein-1» (BCRP-1) qui semble en partie responsable de leur résistance intrinsèque aux agents de chimiothérapie (Liu *et al.*, 2006). Il a été également mis en évidence le rôle pivot de la surexpression de Cox-2 dans la résistance des cellules tumorales à la radiothérapie, l'un des traitements principaux des GBM. À la lumière des rôles de Cox-2 dans la carcinogenèse, des études cliniques ont testé l'ajout d'un inhibiteur de Cox-2 à la radiothérapie afin d'accroître l'efficacité des radiations sur l'induction de la mort cellulaire. Une augmentation de la radiosensibilité par des inhibiteurs de Cox-2 est évidente dans plusieurs variétés de tumeurs. En effet, *in vitro*, des inhibiteurs spécifiques de Cox-2 augmentent la mort des cellules tumorales induite par la radiothérapie dans les cellules issues de tumeurs mammaires murines (Lanza-Jacoby *et al.*, 2004), des carcinomes (Amirghahari *et al.*, 2003), des tumeurs pulmonaires (Pyo *et al.*, 2001), des fibrosarcomes (Raju *et al.*, 2002) et des GBM (Petersen *et al.*, 2000).

Dans une étude réalisée récemment dans notre laboratoire, l'existence d'un axe de signalisation MT1-MMP/Cox-2 a été démontré dans la population de CSC CD133(+) de glioblastome, ce qui suggère l'implication de cet axe de signalisation dans les mécanismes de résistance face aux traitements de radiothérapie et de chimiothérapie ainsi qu'au potentiel invasif de gliome. Dans la présente étude nous avons prouvé l'existence de cette signature moléculaire MT1-MMP/Cox-2 aussi bien chez les cellules de glioblastomes humains U87 que dans les MEFs. Donc, on peut déjà entrevoir le rôle important que notre recherche puisse avoir dans la compréhension des processus de développement, d'invasion et de résistance à la thérapie des gliomes. De plus, nous avons découvert que la signalisation intracellulaire menant vers l'expression de Cox-2 est tout à fait indépendante du domaine catalytique de MT1-MMP. Ceci a été démontré à l'aide de la molécule d'Ilomastat qui est un puissant inhibiteur catalytique des MMPs appartenant à la famille d'hydroxamate (Kocer *et al.*, 2005) (Figure 13-B). À cet égard, nous nous sommes attardés à étudier davantage les effecteurs moléculaires en aval de MT1-MMP responsables de l'induction de l'expression de Cox-2 dans les glioblastomes humains U87, en explorant la voie de NF- κ B dans une variété de modèles cellulaires de fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs).

Identification des effecteurs moléculaires en aval de MT1-MMP impliqués dans l'induction de l'expression de Cox-2

Bien qu'aucun cancer ne soit, à ce jour, décrit comme associé à une mutation ou à un réarrangement de gènes, un nombre important de données suggère fortement l'implication d'une dérégulation de l'activité de NF- κ B dans le développement de certains types de cancers hématopoïétiques. Un élément central de la voie NF- κ B est représenté par le complexe de kinases IKK responsables de la dégradation des inhibiteurs I κ B qui retiennent les dimères NF- κ B dans le cytoplasme. Ce rôle central a pour conséquence le nombre important de pathologies liées à des mutations dans des composants de ce complexe. Trois composants sont actuellement connus: deux protéine kinases, IKK α et IKK β , et une sous-unité régulatrice (NEMO/IKK γ) (Courtois et Israël, 2004).

Dans la présente étude, l'utilisation de modèles cellulaires de fibroblastes embryonnaires de souris a permis d'identifier une voie de signalisation impliquant NF- κ B/IKK γ , qui relie la signalisation intracellulaire de MT1-MMP à l'expression de Cox-2, en la comparant à celle impliquant MT1-MMP sollicitée par un traitement à la Con-A dans les cellules de glioblastomes humains U87. L'induction de l'expression de MT1-MMP via la voie de signalisation NF- κ B dans des fibroblastes dermiques humains, avait déjà été démontrée suite à une stimulation par le TNF- α (Han *et al.*, 2001a). Une autre récente étude a dévoilé la participation d'IKK γ dans le contrôle de la mort cellulaire via l'activation de NF- κ B au cours de la signalisation induite par TNF- α (Legarda-Addison *et al.*, 2009). Par conséquent, les implications moléculaires de la signature MT1-MMP/Cox-2 permettront de mieux comprendre et de mieux cibler les phénomènes de survie cellulaire, et de différenciation impliqués dans le développement tumoral.

Toutefois, tel que mentionné précédemment, les inhibiteurs de l'activité des MMPs décrits jusqu'à présent n'ont pas réussi à apporter des effets bénéfiques lors des essais cliniques, et induisaient également chez certains patients des effets secondaires musculo-squelettiques sévères (Coussens *et al.*, 2002 ; Overall et Kleinfeld, 2006). Par conséquent, l'identification des effecteurs moléculaires en aval de MT1-MMP, qui dépend de la voie de NF- κ B p50/IKK γ , impliqués dans l'induction de l'expression de Cox-2 supportant l'importance du domaine intracellulaire de MT1-MMP. Ainsi, de nouvelles approches de thérapie génique en ciblant soit le domaine cytoplasmique de MT1-MMP ou bien les effecteurs impliqués dans sa signalisation intracellulaire avec une conception rationnelle dans un type cellulaire particulier, sans affecter les autres cellules pourrait être un atout dans la sensibilisation des cellules cancéreuses aux traitements de radiothérapie.

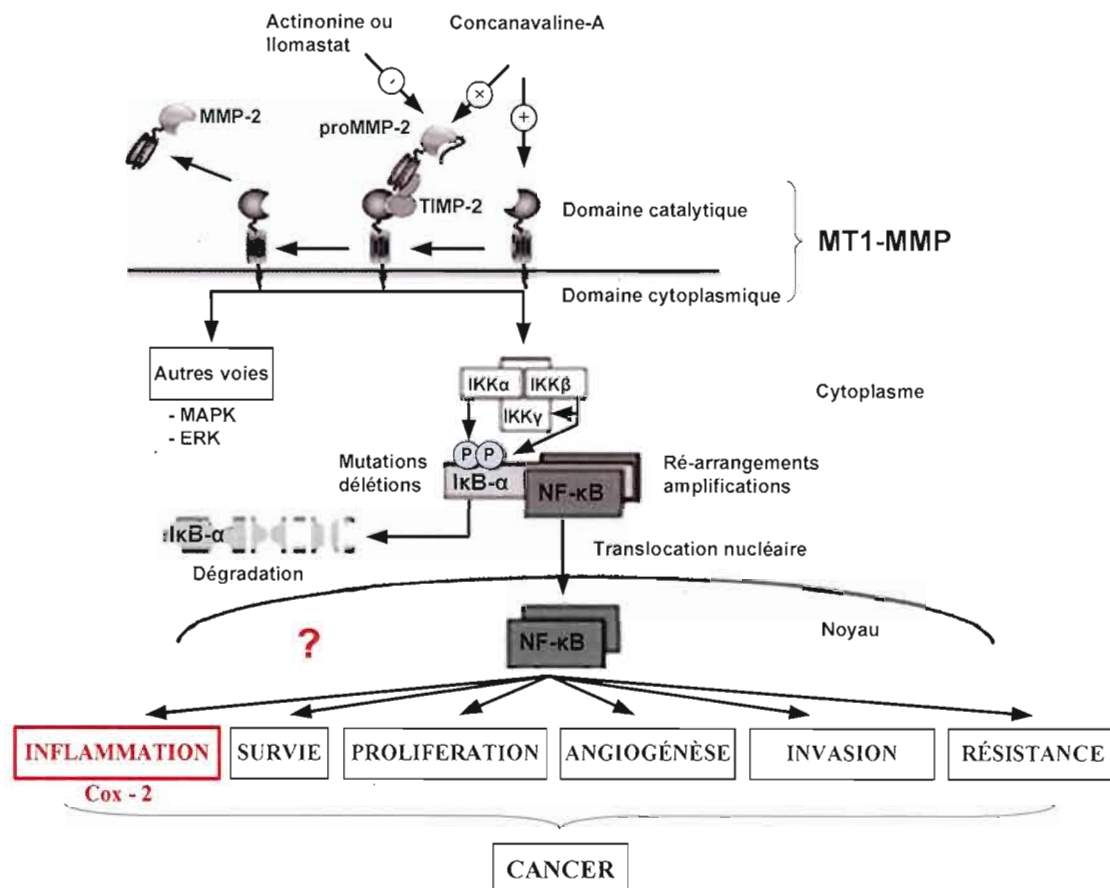
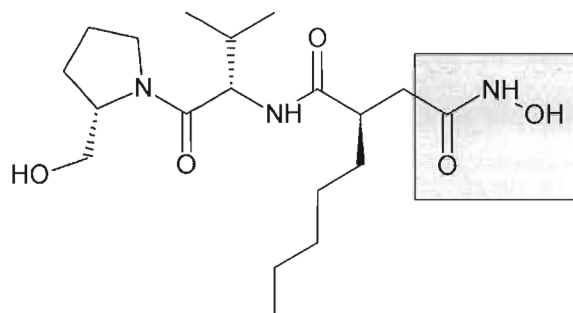


Figure 12: Le ciblage pharmacologique de MT1-MMP et l'implication de son domaine cytoplasmique dans l'inflammation tumorale. L'actinonine inhibe l'activation de la proMMP-2 induite par la Con-A de façon dépendante de MT1-MMP. L'axe MT1-MMP/COX-2 tel que rapporté par notre recherche implique le domaine cytoplasmique de MT1-MMP indépendamment de son domaine catalytique. À part les implications potentielles de NF-κB dans les grandes signatures de la tumorigénèse, la voie NF-κB fait le pont entre MT1-MMP et Cox-2. La protéine kinase IKKγ et la sous-unité p50 sont les deux effecteurs clés dans cette transduction de signal par MT1-MMP qui induit l'expression de Cox-2.

A



B

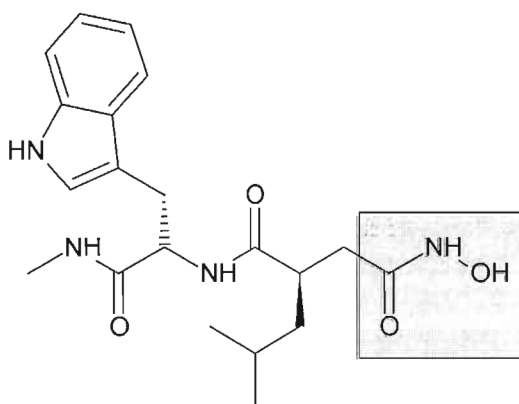


Figure 13: La structure chimique de deux inhibiteurs des MMPs appartenant à la famille d'hydroxamate. A. Actinonine. B. Ilomastat. Ces composés présentent une structure pseudo-peptidique mimant le site de clivage du substrat des MMPs. Ces inhibiteurs entrent donc en compétition avec le substrat des MMPs et se lient au site catalytique par chélation de l'atome de zinc. Le groupement hydroxamate est encadré en gris (Van Aller *et al.*, 2005).

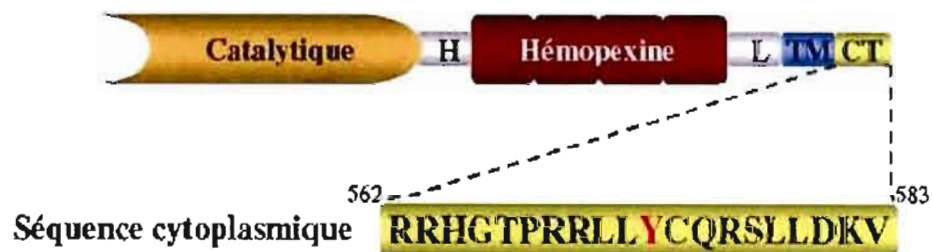


Figure 14: Séquence cytoplasmique de la MT1-MMP. La portion cytoplasmique de la MT1-MMP est constituée de 20 acides aminés et comprend un résidu tyrosine (Y⁵⁷³) qui pourrait être phosphorylé par des kinases. Domaine catalytique; H: domaine charnière (hinge); domaine hémoexine; L: domaine «linker»; TM: domaine transmembranaire; CT: domaine cytoplasmique.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les deux études réalisées dans le cadre de ce mémoire portaient donc sur les caractéristiques fonctionnelles de MT1-MMP dans les cellules de glioblastomes humains U87. Nous rapportons pour la première fois, l'action spécifique de l'actinonine et sa capacité à inhiber la fonction catalytique de MT1-MMP responsable de l'activation de la proMMP-2 dans les cellules de gliomes U87. De plus, nous avons caractérisé d'une manière plus approfondie l'implication de la signalisation intracellulaire de MT1-MMP dans l'induction de l'expression de Cox-2 et qui est indépendante de la fonction catalytique de MT1-MMP. Nous démontrons également que ce nouvel axe MT1-MMP/COX-2 nécessite absolument la voie de signalisation NF- κ B/p50 qui dépend de la sous-unité régulatrice IKK γ .

À la lumière de nos résultats, nous devons élargir la conception simpliste selon laquelle les MMPs sont de simples enzymes de dégradation de la MEC à une vision plus élaborée d'événements intracellulaires modulant diverses voies de signalisation. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires contrôlés par les MMPs *in vivo* et les effets biologiques sur l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et la survie pourrait optimiser l'utilisation des inhibiteurs synthétiques de ces enzymes dans le traitement et la prévention de maladies dont la physiopathologie est complexe tel que le cancer cérébral.

Dans le futur, il faut envisager de nouvelles thérapies anti-ancéreuses ciblées en utilisant des inhibiteurs synthétiques sélectifs des MMPs en association avec les traitements conventionnels (chimiothérapies, radiothérapie...). Une stratégie de sensibilisation des tumeurs cérébrales par irradiation combinée à l'actinonine pourrait être une option thérapeutique pour améliorer le traitement des GBM. De plus, nos résultats supportent également l'investigation d'inhibiteurs des effecteurs de la voie de NF- κ B en clinique pour le traitement de gliomes malins, du fait qu'une première étude pilote a déjà montré l'effet d'un inhibiteur des kinases IKK, le sulfasalazine, sur la suppression de la croissance des GBM dans un modèle *in vivo* de tumeur cérébrale (Robe *et al.*, 2004).

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Ailenberg, M., et M. Silverman. 1996. «Cellular activation of mesangial gelatinase A by cytochalasin D is accompanied by enhanced mRNA expression of both gelatinase A and its membrane-associated gelatinase A activator (MT-MMP)». *Biochemical Journal*, vol. 313, no 3, p. 879-884.
- Amirghahari, N., L. Harrison, M. Smith, X. Rong, I. Naumann, F. Ampil, R. Shi, J. Glass et C. A. O. Nathan. 2003. «NS 398 radiosensitizes an HNSCC cell line by possibly inhibiting radiation-induced expression of COX-2». *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, vol. 57, no 5, p. 1405-1412.
- Anilkumar, N., T. Uekita, J. R. Couchman, H. Nagase, M. Seiki et Y. Itoh. 2005. «Palmitoylation at Cys574 is essential for MT1-MMP to promote cell migration». *FASEB Journal*, vol. 19, no 10, p. 1326-1328.
- Annabi, B., M. Bouzeghrane, R. Moumdjian, A. Moghrabi et R. Béliveau. 2005. «Probing the infiltrating character of brain tumors: Inhibition of RhoA/ROK-mediated CD44 cell surface shedding from glioma cells by the green tea catechin EGCG». *Journal of Neurochemistry*, vol. 94, no 4, p. 906-916.
- Annabi, B., M. Lachambre, N. P. Bousquet-Gagnon, M. Pagé, D. Gingras et R. Béliveau. 2001. «Localization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in caveolae membrane domains». *Biochemical Journal*, vol. 353, no 3, p. 547-553.
- Annabi, B., C. Laflamme, A. Sina, M. P. Lachambre et R. Béliveau. 2009. «A MT1-MMP/NF- κ B signaling axis as a checkpoint controller of COX-2 expression in CD133(+) U87 glioblastoma cells». *Journal of Neuroinflammation*, vol. 6.
- Annabi, B., Y. T. Lee, S. Turcotte, E. Naud, R. R. Desrosiers, M. Champagne, N. Eliopoulos, J. Galipeau et R. Béliveau. 2003. «Hypoxia promotes murine bone-marrow-derived stromal cell migration and tube formation». *Stem Cells*, vol. 21, no 3, p. 337-347.
- Antczak, C., C. Radu et H. Djaballah. 2008. «A profiling platform for the identification of selective metalloprotease inhibitors». *Journal of Biomolecular Screening*, vol. 13, no 4, p. 285-294.
- Appleby, S B, A Ristimäki, K Neilson, K Narko et T Hla. 1994. «Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene». *Biochem. J.*, vol. 302, no 3, p. 723-720.
- Apte, S. S., B. R. Olsen et G. Murphy. 1995. «The gene structure of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 and its inhibitory activities define the distinct TIMP gene family». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no 24, p. 14313-14318.

- Auerbach, W., et R. Auerbach. 1994. «Angiogenesis inhibition: A review». *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 63, no 3, p. 265-311.
- Azzam, H. S., G. Arand, M. E. Lippman et E. W. Thompson. 1993. «Association of MMP-2 activation potential with metastatic progression in human breast cancer cell lines independent of MMP-2 production». *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 85, no 21, p. 1758-1764.
- Baldwin, A. S. 2001. «Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- κ B». *Journal of Clinical Investigation*, vol. 107, no 3, p. 241-246.
- Baramova, E. N., A. Noel, K. Bajou, C. L'Hoir, A. Remacle et J. M. Foidart. 1997. «A role of PA-plasmin system in the cell activation of pro-MMP-9 and in the second step of pro-MMP-2 processing». *Cell Biology International*, vol. 21, no 8, p. 518-519.
- Barnes, P. J., et M. Karin. 1997. «Nuclear factor- κ B - A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases». *New England Journal of Medicine*, vol. 336, no 15, p. 1066-1071.
- Bauvois, B., et D. Dauzonne. 2006. «Aminopeptidase-N/CD13 (EC 3.4.11.2) inhibitors: Chemistry, biological evaluations, and therapeutic prospects». *Medicinal Research Reviews*, vol. 26, no 1, p. 88-130.
- Beckman, R. A., et L. A. Loeb. 2005. «Genetic instability in cancer: Theory and experiment». *Seminars in Cancer Biology*, vol. 15, no 6, p. 423-435.
- Beliën, A. T. J., P. A. Paganetti et M. E. Schwab. 1999. «Membrane-type 1 matrix metalloprotease (MT1-MMP) enables invasive migration of glioma cells in central nervous system white matter». *Journal of Cell Biology*, vol. 144, no 2, p. 373-384.
- Belkaid, A., S. Fortier, J. Caoy et B. Annabi. 2007. «Necrosis induction in glioblastoma cells reveals a new " bioswitch" function for the MT1-MMP/G6PT signaling axis in proMMP-2 activation versus cell death decision». *Neoplasia*, vol. 9, no 4, p. 332-340.
- Bergers, G., R. Brekken, G. McMahon, T. H. Vu, T. Itoh, K. Tamaki, K. Tanzawa, P. Thorpe, S. Itohara, Z. Werb et D. Hanahan. 2000. «Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis». *Nature Cell Biology*, vol. 2, no 10, p. 737-744.
- Bignold, L. P. 2004. «Chaotic genomes make chaotic cells: The mutator phenotype theory of carcinogenesis applied to clinicopathological relationships of solid tumors». *Cancer Investigation*, vol. 22, no 3, p. 338-343.

- Birkedal-Hansen, H., W. G. I. Moore, M. K. Bodden, L. J. Windsor, B. Birkedal-Hansen, A. DeCarlo et J. A. Engler. 1993. «Matrix metalloproteinases: A review». *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, vol. 4, no 2, p. 197-250.
- Blood, C. H., et B. R. Zetter. 1990. «Tumor interactions with the vasculature: Angiogenesis and tumor metastasis». *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, vol. 1032, no 1, p. 89-118.
- Bocchetta, M., et M. Carbone. 2004. «Epidemiology and molecular pathology at crossroads to establish causation: Molecular mechanisms of malignant transformation». *Oncogene*, vol. 23, no 38, p. 6484-6491.
- Bode, W., C. Fernandez-Catalan, H. Tschesche, F. Grams, H. Nagase et K. Maskos. 1999. «Structural properties of matrix metalloproteinases». *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 55, no 4, p. 639-652.
- Brooks, P. C., R. A. F. Clark et D. A. Chersesh. 1994. «Requirement of vascular integrin $\alpha(v)\beta 3$ for angiogenesis». *Science*, vol. 264, no 5158, p. 569-571.
- Brown, P. D., R. E. Bloxidge, S. A. Stuart, K. C. Gatter et J. Carmichael. 1993. «Association between expression of activated 72-kilodalton gelatinase and tumor spread in non-small-cell lung carcinoma». *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 85, no 7, p. 574-578.
- Butler, G. S., M. J. Butler, S. J. Atkinson, H. Will, T. Tamura, S. S. Van Westrum, T. Crabbe, J. Clements, M. P. D'Ortho et G. Murphy. 1998. «The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase 'receptor' regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no 2, p. 871-880.
- Castelli, M. G., C. Chiabrando, R. Fanelli, L. Martelli, G. Butti, P. Gaetani et P. Paoletti. 1989. «Prostaglandin and thromboxane synthesis by human intracranial tumors». *Cancer Research*, vol. 49, no 6, p. 1505-1508.
- Chang, C., et Z. Werb. 2001. «The many faces of metalloproteases: Cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis». *Trends in Cell Biology*, vol. 11, no 11, p. S37-S43.
- Chantrain, C., et Y. A. DeClerck. 2002. Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs synthétiques dans la progression tumorale. *Medecine Sciences*, vol. 18, p. 565-75.
- Collen, A., R. Hanemaaijer, F. Lupu, P. H. A. Quax, N. Van Lent, J. Grimbergen, E. Peters, P. Koolwijk et V. W. M. Van Hinsbergh. 2003. «Membrane-type matrix metalloproteinase-mediated angiogenesis in a fibrin-collagen matrix». *Blood*, vol. 101, no 5, p. 1810-1817.

- Courtois, G., et A. Israël. 2004. «Human pathologies associated with NF- κ B defects». *Pathologies humaines associées à des dysfonctionnements de la voie de signalisation NF- κ B*, vol. 198, no 2, p. 93-96.
- Coussens, L. M., B. Fingleton et L. M. Matrisian. 2002. «Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: Trials and tribulations». *Science*, vol. 295, no 5564, p. 2387-2392.
- Coussens, L. M., et Z. Werb. 1996. «Matrix metalloproteinases and the development of cancer». *Chemistry and Biology*, vol. 3, no 11, p. 895-904.
- Coussens, L. M. 2002. «Inflammation and cancer». *Nature*, vol. 420, no 6917, p. 860-867.
- Crépin, M. 2007. «Metastatic process and therapies». *Mécanismes de la dissémination métastatique et ses thérapies. De la cellule normale aux cellules métastatiques*, vol. 201, no 3, p. 219-221.
- Cuvelier, A., C. Kuntz, R. Sesboué, J. F. Muir et J. P. Martin. 1997. «Matrix metalloproteinases (MMP): Structure and activity». *Les metalloproteinases de la matrice extracellulaire (MMP): Structure et activite*, vol. 14, no 1, p. 1-10.
- D'Amore, P. A., et R. W. Thompson. 1987. «Mechanisms of angiogenesis». *Annual Review of Physiology*, vol. Vol. 49, p. 453-464.
- D'Ortho, M. P., H. Will, S. Atkinson, G. Butler, A. Messent, J. Gavrilovic, B. Smith, R. Timpl, L. Zardi et G. Murphy. 1997. «Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases». *European Journal of Biochemistry*, vol. 250, no 3, p. 751-757.
- Desplaces, A., et M. F. Poupon. 1994. «The metastatic process». *LE PROCESSUS METASTATIQUE*, vol. 81, no 9, p. 751-754.
- Drosos, A. A. 2002. «Newer immunosuppressive drugs: Their potential role in rheumatoid arthritis therapy». *Drugs*, vol. 62, no 6, p. 891-907.
- Drummond, A. H., P. Beckett, P. D. Brown, E. A. Bone, A. H. Davidson, W. A. Galloway, A. J. Gearing, P. Huxley, D. Laber, M. McCourt, M. Whittaker, L. M. Wood et A. Wright. 1999. «Preclinical and clinical studies of MMP inhibitors in cancer». *Ann N Y Acad Sci*, vol. 878, p. 228-235.
- Dvorak, H. F. 1986. «Tumors: Wounds that do not heal: Similarities between tumor stroma generation and wound healing». *New England Journal of Medicine*, vol. 315, no 26, p. 1650-1659.
- Egeblad, M., et Z. Werb. 2002. «New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression». *Nature Reviews Cancer*, vol. 2, no 3, p. 161-174.

- Ferrara, N., et R. S. Kerbel. 2005. «Angiogenesis as a therapeutic target». *Nature*, vol. 438, no 7070, p. 967-974.
- Fillmore, H. L., T. E. VanMeter et W. C. Broaddus. 2001. «Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs): Expression and function during glioma invasion». *Journal of Neuro-Oncology*, vol. 53, no 2, p. 187-202.
- Firestein, G. S., et A. M. Manning. 1999. «Signal transduction and transcription factors in rheumatic disease». *Arthritis and Rheumatism*, vol. 42, no 4, p. 609-621.
- Folkman, J. 2002. «Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis». *Seminars in oncology*, vol. 29, no 6 Suppl 16, p. 15-18.
- Folkman, J. 2003. «Angiogenesis inhibitors: a new class of drugs». *Cancer Biol Ther*, vol. 2, no 4 Suppl 1, p. S127-133.
- Forget, M. A., R. R. Desrosiers et R. Béliveau. 1999. «Physiological roles of matrix metalloproteinases: Implications for tumor growth and metastasis». *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 77, no 7, p. 465-480.
- Fortier, S., D. Labelle, A. Sina, R. Moreau et B. Annabi. 2008. «Silencing of the MT1-MMP/G6PT axis suppresses calcium mobilization by sphingosine-1-phosphate in glioblastoma cells». *FEBS Letters*, vol. 582, no 5, p. 799-804.
- Friedl, P., et K. Wolf. 2003. «Tumour-cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms». *Nature Reviews Cancer*, vol. 3, no 5, p. 362-374.
- Fujimaki, T. 2005. «Surgical treatment of brain metastasis». *International Journal of Clinical Oncology*, vol. 10, no 2, p. 74-80.
- Genís, L., B. G. Gálvez, P. Gonzalo et A. G. Arroyo. 2006. «MT1-MMP: Universal or particular player in angiogenesis?». *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 25, no 1, p. 77-86.
- Ghosh, S., M. J. May et E. B. Kopp. 1998. «NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses». *Annu Rev Immunol*, vol. 16, p. 225-260.
- Giese, A., et M. Westphal. 1996. «Glioma invasion in the central nervous system». *Neurosurgery*, vol. 39, no 2, p. 235-252.
- Gilbert, M. R., et M. Loghin. 2005. «The treatment of malignant gliomas». *Current Treatment Options in Neurology*, vol. 7, no 4, p. 293-303.
- Gingras, D., N. Bousquet-Gagnon, S. Langlois, M. P. Lachambre, B. Annabi et R. Béliveau. 2001. «Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade

- by membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP)». *FEBS Letters*, vol. 507, no 2, p. 231-236.
- Gingras, D., M. Pagé, B. Annabi et R. Béliveau. 2000. «Rapid activation of matrix metalloproteinase-2 by glioma cells occurs through a posttranslational MT1-MMP-dependent mechanism». *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, vol. 1497, no 3, p. 341-350.
- Grant, D. S., K. I. Tashiro, B. Segui-Real, Y. Yamada, G. R. Martin et H. K. Kleinman. 1989. «Two different laminin domains mediate the differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures in vitro». *Cell*, vol. 58, no 5, p. 933-943.
- Grossman, S. A., et J. F. Batara. 2004. «Current management of glioblastoma multiforme». *Seminars in oncology*, vol. 31, no 5, p. 635-644.
- Gupta, G. P., et J. Massagué. 2006. «Cancer Metastasis: Building a Framework». *Cell*, vol. 127, no 4, p. 679-695.
- Gupta, M. K., et R. Y. Qin. 2003. «Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis». *World Journal of Gastroenterology*, vol. 9, no 6, p. 1144-1155.
- Han, Y. P., T. L. Tuan, H. Wu, M. Hughes et W. L. Garner. 2001a. «TNF- α stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF- κ B mediated induction of MT1-MMP». *Journal of Cell Science*, vol. 114, no 1, p. 131-139.
- Han, YP, TL Tuan, H Wu, M Hughes et WL Garner. 2001b. «TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(kappa)B mediated induction of MT1-MMP». *J Cell Sci*, vol. 114, no 1, p. 131-139.
- Hanahan, D., et J. Folkman. 1996. «Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis». *Cell*, vol. 86, no 3, p. 353-364.
- Hanahan, D., et R. A. Weinberg. 2000. «The hallmarks of cancer». *Cell*, vol. 100, no 1, p. 57-70.
- Hayden, M. S., et S. Ghosh. 2008. «Shared Principles in NF- κ B Signaling». *Cell*, vol. 132, no 3, p. 344-362.
- Hiraoka, N., E. Allen, I. J. Apel, M. R. Gyetko et S. J. Weiss. 1998. «Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins». *Cell*, vol. 95, no 3, p. 365-377.
- Hoffmann, A., A. Levchenko, M. L. Scott et D. Baltimore. 2002. «The I κ B-NF- κ B signaling module: Temporal control and selective gene activation». *Science*, vol. 298, no 5596, p. 1241-1245.

- Ingber, D. E., et J. Folkman. 1989. «Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis in vitro: Role of extracellular matrix». *Journal of Cell Biology*, vol. 109, no 1, p. 317-330.
- Inoue, Hiroyasu, Chieko Yokoyama, Shuntaro Hara, Yoshinori Tone et Tadashi Tanabe. 1995. «Transcriptional Regulation of Human Prostaglandin-endoperoxide Synthase-2 Gene by Lipopolysaccharide and Phorbol Ester in Vascular Endothelial Cells». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no 42, p. 24965-24971.
- Itoh, Y., et M. Seiki. 2004. «MT1-MMP: An enzyme with multidimensional regulation». *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 29, no 6, p. 285-289.
- Jiang, A., K. Lehti, X. Wang, S. J. Weiss, J. Keski-Oja et D. Pei. 2001. «Regulation of membrane-type matrix metalloproteinase 1 activity by dynamin-mediated endocytosis». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no 24, p. 13693-13698.
- Johansson, N., M. Ahonen et V. M. Kähäri. 2000. «Matrix metalloproteinases in tumor invasion». *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 57, no 1, p. 5-15.
- Kähäri, V. M., et U. Saarialho-Kere. 1999. «Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion». *Annals of Medicine*, vol. 31, no 1, p. 34-45.
- Kamat, Aparna A., Mavis Fletcher, Lynn M. Gruman, Peter Mueller, Adriana Lopez, Charles N. Landen, Liz Han, David M. Gershenson et Anil K. Sood. 2006. «The Clinical Relevance of Stromal Matrix Metalloproteinase Expression in Ovarian Cancer». *Clinical Cancer Research*, vol. 12, no 6, p. 1707-1714.
- Karin, M. 2006. «Nuclear factor- κ B in cancer development and progression». *Nature*, vol. 441, no 7092, p. 431-436.
- Karin, M., Y. Cao, F. R. Greten et Z. W. Li. 2002. «NF- κ B in cancer: From innocent bystander to major culprit». *Nature Reviews Cancer*, vol. 2, no 4, p. 301-310.
- Kehlen, A., U. Lendeckel, H. Dralle, J. Langner et C. Hoang-Vu. 2003. «Biological Significance of Aminopeptidase N/CD13 in Thyroid Carcinomas». *Cancer Research*, vol. 63, no 23, p. 8500-8506.
- Kinzler, K. W., et B. Vogelstein. 1996. «Lessons from hereditary colorectal cancer». *Cell*, vol. 87, no 2, p. 159-170.
- Knäuper, V., C. López-Otin, B. Smith, G. Knight et G. Murphy. 1996. «Biochemical characterization of human collagenase-3». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, no 3, p. 1544-1550.

- Kocer, S. S., S. G. Walker, B. Zerler, L. M. Golub et S. R. Simon. 2005. «Metalloproteinase inhibitors, nonantimicrobial chemically modified tetracyclines, and Ilomastat block *Bacillus anthracis* lethal factor activity in viable cells». *Infection and Immunity*, vol. 73, no 11, p. 7548-7557.
- Kolaczowska, E., A. Goldys, E. Kozakiewicz, M. Lelito, B. Plytycz, N. Van Rooijen et B. Arnold. 2009. «Resident peritoneal macrophages and mast cells are important cellular sites of COX-1 and COX-2 activity during acute peritoneal inflammation». *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, vol. 57, no 6, p. 459-466.
- Koshikawa, N., G. Giannelli, V. Cirulli, K. Miyazaki et V. Quaranta. 2000. «Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5». *Journal of Cell Biology*, vol. 148, no 3, p. 615-624.
- Krapppmann, D., E. N. Hatada, S. Tegethoff, J. Li, A. Klippel, K. Giese, P. A. Baeuerle et C. Scheidereit. 2000. «The I κ B kinase (IKK) complex is tripartite and contains IKK γ but not IKAP as a regular component». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no 38, p. 29779-29787.
- Kuper, H., H. O. Adami et D. Trichopoulos. 2000. «Infections as a major preventable cause of human cancer». *Journal of Internal Medicine*, vol. 248, no 3, p. 171-183.
- Labrecque, L., C. Nyalendo, S. Langlois, Y. Durocher, C. Roghi, G. Murphy, D. Gingras et R. Béliveau. 2004. «Src-mediated tyrosine phosphorylation of caveolin-1 induces its association with membrane type 1 matrix metalloproteinase». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no 50, p. 52132-52140.
- Lafleur, M. A., M. M. Handsley et D. R. Edwards. 2003. «Metalloproteinases and their inhibitors in angiogenesis». *Expert reviews in molecular medicine*, vol. 5, no 23, p. 1-39.
- Lafleur, M. A., M. M. Handsley, V. Knäuper, G. Murphy et D. R. Edwards. 2002. «Endothelial tubulogenesis within fibrin gels specifically requires the activity of membrane-type-matrix metalloproteinases (MT-MMPs)». *Journal of Cell Science*, vol. 115, no 17, p. 3427-3438.
- Lampert, K., U. Machein, M. R. Machein, W. Conca, H. H. Peter et B. Volk. 1998. «Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in human brain tumors». *American Journal of Pathology*, vol. 153, no 2, p. 429-437.
- Langlois, S., D. Gingras et R. Béliveau. 2004. «Membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) cooperates with sphingosine 1-phosphate to induce endothelial cell migration and morphogenic differentiation». *Blood*, vol. 103, no 8, p. 3020-3028.
- Lanza-Jacoby, S., A. P. Dicker, S. Miller, F. E. Rosato, J. T. Flynn, S. N. Lavorgna et R. Burd. 2004. «Cyclooxygenase (COX)-2-dependent effects of the inhibitor SC236

- when combined with ionizing radiation in mammary tumor cells derived from HER-2/neu mice». *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 3, no 4, p. 417-424.
- Lee, G. Y. H., et C. T. Lim. 2007. «Biomechanics approaches to studying human diseases». *Trends in Biotechnology*, vol. 25, no 3, p. 111-118.
- Lee, M. D., Y. She, M. J. Soskis, C. P. Borella, J. R. Gardner, P. A. Hayes, B. M. Dy, M. L. Heaney, M. R. Philips, W. G. Bornmann, F. M. Sirotnak et D. A. Scheinberg. 2004. «Human mitochondrial peptide deformylase, a new anticancer target of actinonin-based antibiotics». *Journal of Clinical Investigation*, vol. 114, no 8, p. 1107-1116.
- Legarda-Addison, D., H. Hase, M. A. O'Donnell et A. T. Ting. 2009. «NEMO/IKK γ regulates an early NF- κ B-independent cell-death checkpoint during TNF signaling». *Cell Death and Differentiation*, vol. 16, no 9, p. 1279-1288.
- Lehti, K., J. Lohi, H. Valtanen et J. Keski-Oja. 1998. «Proteolytic processing of membrane-type-1 matrix metalloproteinase is associated with gelatinase A activation at the cell surface». *Biochemical Journal*, vol. 334, no 2, p. 345-353.
- Lehti, K., H. Valtanen, S. Wickström, J. Lohi et J. Keski-Oja. 2000. «Regulation of membrane-type-1 matrix metalloproteinase activity by its cytoplasmic domain». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no 20, p. 15006-15013.
- Lelièvre, S., V. M. Weaver et M. J. Bissell. 1996. «Extracellular matrix signaling from the cellular membrane skeleton to the nuclear skeleton: A model of gene regulation». *Recent Progress in Hormone Research*, vol. 51, p. 417-432.
- Liu, G., X. Yuan, Z. Zeng, P. Tunici, H. Ng, I. R. Abdulkadir, L. Lu, D. Irvin, K. L. Black et J. S. Yu. 2006. «Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma». *Molecular Cancer*, vol. 5.
- Lohi, J., et J. Keski-Oja. 1995. «Calcium ionophores decrease pericellular gelatinolytic activity via inhibition of 92-kDa gelatinase expression and decrease of 72-kDa gelatinase activation». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no 29, p. 17602-17609.
- Magné, N., C. Didelot, R. A. Toillon, P. Van Houtte et J. F. Peyron. 2004. «Biomodulation of transcriptional factor NF- κ B by ionizing radiation». *Biomodulation du facteur de transcription NF- κ B par les radiations ionisantes*, vol. 8, no 5, p. 315-321.
- Mañes, S., M. Llorente, R. A. Lacalle, C. Gómez-Moutón, L. Kremer, E. Mira et C. Martínez-A. 1999. «The matrix metalloproteinase-9 regulates the insulin-like growth factor- triggered autocrine response in DU-145 carcinoma cells». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no 11, p. 6935-6945.

- Massova, I., L. P. Kotra, R. Fridman et S. Mobashery. 1998. «Matrix metalloproteinases: Structures, evolution, and diversification». *FASEB Journal*, vol. 12, no 12, p. 1075-1095.
- Mennecier, B. 2007. «The actual place of anti-angiogenesis in non-small cell lung cancer». *Place actuelle des anti-angiogéniques dans le traitement des cancers bronchiques primitifs*, vol. 24, no 8 C2, p. 6S198-196S205.
- Murphy, G., et A. J. Docherty. 1992. «The matrix metalloproteinases and their inhibitors». *American journal of respiratory cell and molecular biology*, vol. 7, no 2, p. 120-125.
- Murphy, G., H. Stanton, S. Cowell, G. Butler, V. Knauper, S. Atkinson et J. Gavrilovic. 1999. «Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation». *APMIS*, vol. 107, no 1, p. 38-44.
- Nagase, Hideaki, et J. Frederick Woessner. 1999. «Matrix Metalloproteinases». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no 31, p. 21491-21494.
- Nakada, M., A. Yamada, T. Takino, H. Miyamori, T. Takahashi, J. Yamashita et H. Sato. 2001. «Suppression of membrane-type I matrix metalloproteinase (MMP)-mediated MMP-2 activation and tumor invasion by testican 3 and its splicing variant gene product, N-Tes». *Cancer Research*, vol. 61, no 24, p. 8896-8902.
- Nelson, A. R., B. Fingleton, M. L. Rothenberg et L. M. Matrisian. 2000. «Matrix metalloproteinases: Biologic activity and clinical implications». *Journal of Clinical Oncology*, vol. 18, no 5, p. 1135-1149.
- Ninomiya-Tsuji, J., K. Kishimoto, A. Hiyama, J. I. Inoue, Z. Cao et K. Matsumoto. 1999. «The kinase TAK1 can activate the NIK-I κ B as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway». *Nature*, vol. 398, no 6724, p. 252-256.
- Nozaki, M., M. Tada, H. Kobayashi, C. L. Zhang, Y. Sawamura, H. Abe, N. Ishii et E. G. Van Meir. 1999. «Roles of the functional loss of p53 and other genes in astrocytoma tumorigenesis and progression». *Neuro-Oncology*, vol. 1, no 2, p. 124-137.
- Nyalendo, C., M. Michaud, E. Beaulieu, C. Roghi, G. Murphy, D. Gingras et R. Béliveau. 2007. «Src-dependent phosphorylation of membrane type I matrix metalloproteinase on cytoplasmic tyrosine 573: Role in endothelial and tumor cell migration». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no 21, p. 15690-15699.
- Oh, J., R. Takahashi, S. Kondo, A. Mizoguchi, E. Adachi, R. M. Sasahara, S. Nishimura, Y. Imamura, H. Kitayama, D. B. Alexander, C. Ide, T. P. Horan, T. Arakawa, H. Yoshida, S. I. Nishikawa, Y. Itoh, M. Seiki, S. Itohara, C. Takahashi et M. M. Noda. 2001. «The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis». *Cell*, vol. 107, no 6, p. 789-800.

- Ohuchi, E., K. Imai, Y. Fujii, H. Sato, M. Seiki et Y. Okada. 1997. «Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no 4, p. 2446-2451.
- Okada, A., J. P. Belloc, N. Rouyer, M. P. Chenard, M. C. Rio, P. Chambon et P. Basset. 1995. «Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast, and head and neck carcinomas». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, no 7, p. 2730-2734.
- Osenkowski, P., M. Toth et R. Fridman. 2004. «Processing, shedding, and endocytosis of membrane type 1-Matrix metalloproteinase (MT1-MMP)». *Journal of Cellular Physiology*, vol. 200, no 1, p. 2-10.
- Overall, C. M., et O. Kleinfeld. 2006. «Validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy». *Nature Reviews Cancer*, vol. 6, no 3, p. 227-239.
- Özen, Ö., B. Krebs, B. Hemmerlein, A. Pekrun, H. Kretzschmar et J. Herms. 2004. «Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in medulloblastomas and their prognostic relevance». *Clinical Cancer Research*, vol. 10, no 14, p. 4746-4753.
- Paoletti, P., C. Chiabrando, P. Gaetani, M. G. Castelli, G. Butti, L. Martelli et M. Rolli. 1989. «Prostaglandins in human brain tumors». *Journal of Neurosurgical Sciences*, vol. 33, no 1, p. 65-69.
- Petersen, C., S. Petersen, L. Milas, F. F. Lang et P. J. Tofilon. 2000. «Enhancement of intrinsic tumor cell radiosensitivity induced by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor». *Clinical Cancer Research*, vol. 6, no 6, p. 2513-2520.
- Pieczky, M., et P. Anderson. 2001. «Signal transduction in rheumatoid arthritis». *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology*, vol. 15, no 5, p. 789-803.
- Polette, M., C. Gilles, V. Marchand, M. Seiki, J. M. Tournier et P. Birembaut. 1997. «Induction of membrane-type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP) expression in human fibroblasts by breast adenocarcinoma cells». *Clinical and Experimental Metastasis*, vol. 15, no 2, p. 157-163.
- Pyo, H., H. Choy, G. P. Amorino, J. S. Kim, Q. Cao, S. K. Hercules et R. N. DuBois. 2001. «A selective Cyclooxygenase-2 inhibitor, NS-398, enhances the effect of radiation in vitro and in vivo preferentially on the cells that express Cyclooxygenase-2». *Clinical Cancer Research*, vol. 7, no 10, p. 2998-3005.
- Raju, U., E. Nakata, P. Yang, R. A. Newman, K. K. Ang et L. Milas. 2002. «In vitro enhancement of tumor cell radiosensitivity by a selective inhibitor of

- cyclooxygenase-2 enzyme: mechanistic considerations». *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, vol. 54, no 3, p. 886-894.
- Rangel, R., Y. Sun, L. Guzman-Rojas, M. G. Ozawa, J. Sun, R. J. Giordano, C. S. Van Pelt, P. T. Tinkey, R. R. Behringer, R. L. Sidman, W. Arap et R. Pasqualini. 2007. «Impaired angiogenesis in aminopeptidase N-null mice». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no 11, p. 4588-4593.
- Rannou, F., M. François, M. T. Corvol et F. Berenbaum. 2005. «Cartilage deterioration and rheumatoid arthritis». *Dégradation du cartilage et polyarthrite rhumatoïde*, vol. 72, no 4, p. 322-330.
- Robe, P. A., M. Bentires-Alj, M. Bonif, B. Rogister, M. Deprez, H. Haddada, M. T. N. Khac, O. Jolois, K. Erkmen, M. P. Merville, P. M. Black et V. Bours. 2004. «In vitro and in vivo activity of the nuclear factor- κ B inhibitor sulfasalazine in human glioblastomas». *Clinical Cancer Research*, vol. 10, no 16, p. 5595-5603.
- Rozanov, D. V., E. I. Deryugina, B. I. Ratnikov, E. Z. Monosov, G. N. Marchenko, J. P. Quigley et A. Y. Strongin. 2001. «Mutation analysis of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP): The role of the cytoplasmic tail Cys574, the active site Glu 240, and furin cleavage motifs in oligomerization, processing, and self-proteolysis of MT1-MMP expressed in breast carcinoma cells». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no 28, p. 25705-25714.
- Sato, H., T. Takino, Y. Okada, J. Cao, A. Shinagawa, E. Yamamoto et M. Seiki. 1994. «A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells». *Nature*, vol. 370, no 6484, p. 61-65.
- Senger, D. R. 1996. «Molecular framework for angiogenesis: a complex web of interactions between extravasated plasma proteins and endothelial cell proteins induced by angiogenic cytokines». *The American journal of pathology*, vol. 149, no 1, p. 1-7.
- Shalinsky, D. R., J. Brekken, H. Zou, C. D. McDermott, P. Forsyth, D. Edwards, S. Margosiak, S. Bender, G. Truitt, A. Wood, N. M. Varki et K. Appelt. 1999. «Broad antitumor and antiangiogenic activities of AG3340, a potent and selective MMP inhibitor undergoing advanced oncology clinical trials». *Ann N Y Acad Sci*, vol. 878, p. 236-270.
- Shishodia, S., et B. B. Aggarwal. 2004. «Cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor celecoxib abrogates activation of cigarette smoke-induced nuclear factor (NF)- κ B by suppressing activation of I κ B α kinase in human non-small cell lung carcinoma: Correlation with suppression of cyclin D1, COX-2, and matrix metalloproteinase-9». *Cancer Research*, vol. 64, no 14, p. 5004-5012.

- Sirvent, N., V. Imbert, C. Frelin, E. Griessinger et J. F. Peyron. 2003. «Fighting cancer via NF- κ B inhibition». *NF- κ B, une nouvelle cible thérapeutique en cancérologie*, vol. 10, no 7, p. 632-634.
- Smith, W. L., D. L. DeWitt et R. M. Garavito. 2000. «Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology». *Annu Rev Biochem*, vol. 69, p. 145-182.
- Société-canadienne-du-cancer (2009). Statistiques canadiennes sur le cancer: Le cancer au Canada, les frais en bref.
- Stamenkovic, I. 2000. «Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis». *Seminars in Cancer Biology*, vol. 10, no 6, p. 415-433.
- Statistics-Canada (2009). Canadian Cancer Statistique, Canadian Cancer Society, National Cancer Institute of Canada, Public Health Agency of Canada.
- Sternlicht, M. D., et Z. Werb. 2001. «How matrix metalloproteinases regulate cell behavior». *Annu Rev Cell Dev Biol*, vol. 17, p. 463-516.
- Stetler-Stevenson, W. G., et A. E. Yu. 2001. «Proteases in invasion: Matrix metalloproteinases». *Seminars in Cancer Biology*, vol. 11, no 2, p. 143-152.
- Stocker, W., F. Grams, U. Baumann, P. Reinemer, F. X. Gomis-Ruth, D. B. McKay et W. Bode. 1995. «The metzincins - Topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralsins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases». *Protein Science*, vol. 4, no 5, p. 823-840.
- Strongin, A. Y., I. Collier, G. Bannikov, B. L. Marmer, G. A. Grant et G. I. Goldberg. 1995. «Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no 10, p. 5331-5338.
- Takino, T., H. Miyamori, Y. Watanabe, K. Yoshioka, M. Seiki et H. Sato. 2004. «Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase Regulates Collagen-Dependent Mitogen-Activated Protein/Extracellular Signal-Related Kinase Activation and Cell Migration». *Cancer Research*, vol. 64, no 3, p. 1044-1049.
- Temel, S. G., et Z. Kahveci. 2010. «Cyclooxygenase-2 expression in astrocytes and microglia in human oligodendroglioma and astrocytoma». *Journal of Molecular Histology*, p. 1-9.
- Timpl, R., et J. C. Brown. 1996. «Supramolecular assembly of basement membranes». *BioEssays*, vol. 18, no 2, p. 123-132.
- Tomasek, J. J., N. L. Halliday, D. L. Updike, J. S. Ahern-Moore, T. K. H. Vu, R. W. Liu et E. W. Howard. 1997. «Gelatinase A activation is regulated by the organization of the

- polymerized actin cytoskeleton». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no 11, p. 7482-7487.
- Toth, M., S. Hernandez-Barrantes, P. Osenkowski, M. Margarida Bernardo, D. C. Gervasi, Y. Shimura, O. Meroueh, L. P. Kotra, B. G. Gálvez, A. G. Arroyo, S. Mobashery et R. Fridman. 2002. «Complex pattern of membrane type 1 matrix metalloproteinase shedding. Regulation by autocatalytic cell surface inactivation of active enzyme». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no 29, p. 26340-26350.
- Tsuji, M., S. Kawano, S. Tsuji, H. Sawaoko, M. Hori et R. N. DuBois. 1998. «Erratum: Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells (Cell 93 (705-716))». *Cell*, vol. 94, no 2.
- Tysnes, B. B., et R. Mahesparan. 2001. «Biological mechanisms of glioma invasion and potential therapeutic targets». *Journal of Neuro-Oncology*, vol. 53, no 2, p. 129-147.
- Uekita, T., Y. Itoh, I. Yana, H. Ohno et M. Seiki. 2001. «Cytoplasmic tail-dependent internalization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase is important for its invasion-promoting activity». *Journal of Cell Biology*, vol. 155, no 7, p. 1345-1356.
- Van Aller, G. S., R. Nandigama, C. M. Petit, W. E. DeWolf Jr, C. J. Quinn, K. M. Aubart, M. Zalacain, S. B. Christensen, R. A. Copeland et Z. Lai. 2005. «Mechanism of time-dependent inhibition of polypeptide deformylase by actinonin». *Biochemistry*, vol. 44, no 1, p. 253-260.
- Van Wart, H E, et H Birkedal-Hansen. 1990. «The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, no 14, p. 5578-5582.
- Vu, T. H., et Z. Werb. 2000. «Matrix metalloproteinases: Effectors of development and normal physiology». *Genes and Development*, vol. 14, no 17, p. 2123-2133.
- Weil, R., et A. Israel. 2006. «Deciphering the pathway from the TCR to NF-[kappa]B». *Cell Death Differ*, vol. 13, no 5, p. 826-833.
- Weinberg, R. A. 1989. «Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis». *Cancer Research*, vol. 49, no 14, p. 3713-3721.
- Werb, Z. 1997. «ECM and cell surface proteolysis: Regulating cellular ecology». *Cell*, vol. 91, no 4, p. 439-442.
- Widera, D., I. Mikenberg, B. Kaltschmidt et C. Kaltschmidt. 2006. «Potential role of NF- κ B in adult neural stem cells: The underrated steersman?». *International Journal of Developmental Neuroscience*, vol. 24, no 2-3, p. 91-102.

- Wild-Bode, Christine, Michael Weller, Andreas Rimner, Johannes Dichgans et Wolfgang Wick. 2001. «Sublethal Irradiation Promotes Migration and Invasiveness of Glioma Cells: Implications for Radiotherapy of Human Glioblastoma». *Cancer Res*, vol. 61, no 6, p. 2744-2750.
- Williams, C. S., M. Tsujii, J. Reese, S. K. Dey et R. N. DuBois. 2000. «Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth». *Journal of Clinical Investigation*, vol. 105, no 11, p. 1589-1594.
- Wojtowicz-Praga, S., J. Torri, M. Johnson, V. Steen, J. Marshall, E. Ness, R. Dickson, M. Sale, H. S. Rasmussen, T. A. Chiodo et M. J. Hawkins. 1998. «Phase I trial of Marimastat, a novel matrix metalloproteinase inhibitor, administered orally to patients with advanced lung cancer». *Journal of Clinical Oncology*, vol. 16, no 6, p. 2150-2156.
- Yamamoto, Kei, Toshiya Arakawa, Natsuo Ueda et Shozo Yamamoto. 1995. «Transcriptional Roles of Nuclear Factor B and Nuclear Factor-Interleukin-6 in the Tumor Necrosis Factor -Dependent Induction of Cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 Cells». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no 52, p. 31315-31320.
- Yamamoto, S., K. Yamamoto, H. Kurobe, R. Yamashita, H. Yamaguchi et N. Ueda. 1998. «Transcriptional regulation of fatty acid cyclooxygenases-1 and -2». *International Journal of Tissue Reactions*, vol. 20, no 1, p. 17-22.
- Yu, M., H. Sato, M. Seiki et E. W. Thompson. 1995. «Complex regulation of membrane-type matrix metalloproteinase expression and matrix metalloproteinase-2 activation by concanavalin A in MDA-MB-231 human breast cancer cells». *Cancer Research*, vol. 55, no 15, p. 3272-3277.
- Zhai, Y., K. B. Hotary, B. Nan, F. X. Bosch, N. Muñoz, S. J. Weiss et K. R. Cho. 2005. «Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase is associated with cervical carcinoma progression and invasion». *Cancer Research*, vol. 65, no 15, p. 6543-6550.